

Lichtinduzierte Depression:

Etablierung eines neuen Mausmodells
zur Untersuchung depressiver
Erkrankungen beim Menschen

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Willhelms-Universität Bonn

Vorgelegt von
Astrid Becker
aus
Karlsruhe

Bonn, Oktober 2010

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter:	Prof. Dr. Andreas Zimmer
2. Gutachter:	Prof. Dr. Michael Hofmann

Tag der Promotion:	02.03.2011
--------------------	------------

Erscheinungsjahr:	2011
-------------------	------

„Inmitten der Schwierigkeiten liegt die Möglichkeit.“

Albert Einstein

Physiker (1879 – 1955)

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mir mit Rat und Tat während der Dauer dieses Projektes beigestanden, die mich durch ihre aktive Diskussion in meinem Thema vorangebracht und mich bei der Realisierung dieses Projektes unterstützt haben:

„DANKE!“

Zusammenfassung

Etwa 16 % der Weltbevölkerung erleiden mindestens einmal in ihrem Leben eine depressive Episode. Von den Betroffenen sprechen jedoch nur weniger als ein Drittel auf die eingesetzten Antidepressiva an. Eine bessere und effektivere Pharmakotherapie ist daher dringend nötig. Verursacht werden depressive Erkrankungen durch das Zusammenspiel von Genetik und Umwelt. Als besonders einflussreiche Faktoren gelten aufreibende Lebensereignisse oder Phasen von chronischem Stress, da sie häufig depressiven Episoden vorausgehen. Die molekularen und zellulären Mechanismen der Krankheit sind allerdings bis heute nicht eindeutig aufgedeckt. Valide Tiermodelle, durch die kausal wirksame und nicht nur symptomatisch effektive Medikamente entwickelt werden können, sind demnach von großer Bedeutung. Unter diesem Gesichtspunkt wurde in der vorliegenden Arbeit ein neuer Modellansatz entworfen und validiert. Es wurde der Einfluss einer chronisch belastenden Umgebung auf Labormäuse untersucht. Der Stress für nachtaktive C3H/HeN Mäuse besteht bei diesem neuen Modell in der Veränderung des Licht-Dunkel Lichtzyklus. Ein 12:12 Stunden Rhythmus wird für mehrere Wochen auf eine konstante Beleuchtung oder ein 22:02 Stunden Intervall geändert. Als Reaktion auf die veränderten Umweltbedingungen zeigten die Tiere ein komplexes Syndrom. Charakteristisch waren eine Reduzierung der Aktivität im vertrauten Heimkäfig, Anhedonie, Hyperaktivität in einer fremden Umgebung sowie ein vermindertes Interesse der Mäuse an Artgenossen. Auf molekularer Ebene wurden Veränderungen in Parametern der Stressachse belegt. Serumcorticosteroide waren erhöht, Nebennieren vergrößert und die Expression von stressassoziierten Genen verändert. Eine chronische antidepressive Medikation normalisierte die beobachteten Veränderungen.

Obwohl sich der hier vorgestellte Versuchsansatz von anderen Modellen zur Untersuchung depressiver Erkrankungen unterscheidet, gibt es eine weitgehende Übereinstimmung der ermittelten Symptomatik zu etablierten Depressionsmodellen wie der olfaktorischen Bulbektomie, Modellen für sozialen Isolations- oder Konfliktstress, dem Modell vom chronischen, milden Stress oder Depressionsmodellen auf Basis genetisch modifizierter Tiere. Der hier vorgestellte innovative Versuchsansatz induziert demnach durch Verlängerung der Lichtperiode bei nachtaktiven C3H/HeN Mäusen zuverlässig ein komplexes, depressionsähnliches Syndrom, und leistet so einen wertvollen Beitrag zur Erforschung depressiver Erkrankungen.

Abstract

Depression is a complex disorder with a lifetime prevalence of about 16%. Unfortunately, two third of the patients do not achieve remission with first-line antidepressants. Thus, there is an urgent medical need for a better and more effective pharmacotherapy, as well as for valid animal models to study depression. Today it is believed that depression is caused by an interaction between genetic and environmental factors, but the underlying molecular and cellular pathomechanisms are still not fully understood. Stressful life events or periods of chronic stress are often preceding the onset of depressive illnesses and thus increased attention has been paid on stress in the context of depressive disorders in the recent years. Therefore, the aim of the present work was to analyze the influence of a chronic stressful environment on laboratory mice using a new animal model, designed and established in this project, to study depression. This new animal model comprises the exposure of nocturnal active, melatonin proficient C3H/HeN mice to 22 hours of artificial daylight or constant illumination instead of a circadian 12:12 hour light-dark cycle. Extension of the light phase induced a complex behavioral depression-like syndrome consisting of decreased home cage activity, sucrose anhedonia and hyperactivity in unfamiliar environments like the open field or a novel cage as well as a reduced social affinity for conspecifics. Consistent with behavioral effects, a modulation of stress-axis key components was observed in stress-exposed mice. Changes included increased blood corticosterone levels and modified expression of corticotropin-releasing genes and other stress associated ones. Chronic administration of antidepressants had strong impact on the observed behavioral and molecular symptoms.

Although the design of this new model differs from other established, rodent models of depression, analogue changes have been observed in prominent animal models of depression such as olfactory bulbectomy, social isolation or conflict models, the chronic mild stress model or in the model of genetically modified animals. As a result, disruption of the circadian rhythm by extending the daily light period produced a complex depression-like state in C3H/HeN mice and represents a useful, reliable and novel animal model to study depression.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	V
Abstract	VII
Inhaltsverzeichnis.....	IX
Abkürzungsverzeichnis.....	XII
1 Einleitung	1
1.1 Tiermodelle.....	3
1.1.1 Stressmodelle	5
1.1.2 Läsionsmodelle	8
1.1.3 Pharmakologische Modelle	9
1.1.4 Genetische Modelle	9
1.1.5 Methoden zur Charakterisierung antidepressiver Substanzen.....	10
1.2 Hypothesen zur Depression	11
1.2.1 Monoamin-Mangel-Hypothese	11
1.2.2 Neurotrophin-Hypothese.....	13
1.2.3 Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Hypothese	15
1.3 Saisonal abhängige Depression	18
1.4 Melatonin	20
1.5 Argumente für die Etablierung eines neuen Mausmodells	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Materialien	23
2.1.1 Arbeitsgeräte	23
2.1.2 Chemikalien	24
2.1.3 Verbrauchsmaterial.....	25
2.1.4 Kits für die Molekularbiologie	25
2.1.5 Taqman Assays	26
2.1.6 Antikörper	26
2.1.7 Enzyme.....	27
2.1.8 Puffer und Lösungen	27
2.1.9 Computersoftware und Datenbanken	28
2.2 Versuchstiere	29
2.3 Medikamentöse Behandlung	29
2.4 Methoden zur Verhaltensanalyse	30
2.4.1 Heimkäfigaktivität.....	30
2.4.2 Saccharin-Präferenz-Test.....	30
2.4.3 Sucrose-Präferenz-Test.....	31
2.4.4 Offenfeld-Test	31

2.4.5	„ <i>novelty suppressed feeding</i> “-Test	32
2.4.6	„ <i>novel-cage</i> “-Test	32
2.4.7	„ <i>forced-swimming</i> “-Test.....	33
2.4.8	„ <i>tail-suspension</i> “-Test.....	33
2.4.9	Test auf soziale Affinität	34
2.4.10	Bestimmung von Körpergewicht und Futterkonsum	34
2.5	Molekularbiologische Methoden.....	35
2.5.1	Blutaufbereitung und Blutanalyse.....	35
2.5.2	Organentnahme	35
2.5.3	Präparation der Gehirnareale.....	35
2.5.4	Quantitätsbestimmung von RNA und Proteinen.....	36
2.5.5	Qualitätsbestimmung der RNA.....	36
2.5.6	Microarray - Technologie.....	37
2.5.7	cDNA Synthese.....	38
2.5.8	Quantitative <i>real-time</i> PCR.....	38
2.5.9	BDNF Proteinbestimmung.....	40
2.5.10	Gewichtsbestimmung der Nebennieren	40
2.6	Immunhistochemie.....	41
2.6.1	BrdU Injektion.....	41
2.6.2	Transkardiale Perfusion	42
2.6.3	Postfixierung des Gewebes.....	42
2.6.4	Anfertigung und Lagerung der Gehirnschnitte.....	42
2.6.5	Quantifizierung BrdU-positiver Zellen.....	43
2.6.6	Charakterisierung BrdU-positiver Zellen.....	44
2.6.7	Negativkontrolle.....	44
2.7	Experimentelles Design	45
2.7.1	Vorversuch	45
2.7.2	Erstellung eines 24 Stunden Profils.....	46
2.7.3	Illuminationsversuch 1	47
2.7.4	Illuminationsversuch 2.....	49
2.7.5	Illuminationsversuch 3.....	50
3	Ergebnisse.....	51
3.1	Vorversuch.....	51
3.1.1	Saccharin-Präferenz-Test	51
3.1.2	Offenfeld-Test	52
3.1.3	„ <i>forced swimming</i> “-Test.....	55
3.1.4	qRT-PCR.....	56
3.2	24 Stunden Profil	58
3.2.1	Offenfeld-Test	58
3.2.2	„ <i>tail-suspension</i> “-Test.....	60
3.2.3	„ <i>forced-swimming</i> “-Test.....	61

3.2.4	Corticosteron	62
3.3	Illuminationsversuch 1	63
3.3.1	Heimkäfigaktivität.....	64
3.3.2	Sucrose-Präferenz-Test.....	67
3.3.3	Offenfeld-Test	68
3.3.4	Aktivitätstest in neuem Heimkäfig	69
3.3.5	Corticosteron	70
3.3.6	Nebennierengewicht	71
3.3.7	Expression HHN-Achsen assoziierter Gene	72
3.3.8	BDNF Proteinbestimmung	73
3.3.9	Neurogenese	74
3.4	Illuminationsversuch 2	76
3.4.1	Heimkäfigaktivität.....	77
3.4.2	Sucrose-Präferenz-Test.....	78
3.4.3	Offenfeld-Test	79
3.4.4	Sozialer Affinitätstest	80
3.4.5	Körpergewicht und Futterkonsum	81
3.4.6	Microarray Analyse	82
3.4.7	qRT-PCR	84
	Illuminationsversuch 3	86
3.4.8	Heimkäfigaktivität.....	86
3.4.9	Offenfeld-Test	88
3.4.10	„ <i>novelty suppressed feeding</i> “-Test.....	89
3.4.11	Nebennierengewicht	90
3.4.12	Körpergewicht.....	91
3.4.13	qRT-PCR des CRH R1 Gens.....	92
4	Diskussion	93
4.1	Illuminationsversuch 1	94
4.2	Illuminationsversuch 2	103
4.3	Illuminationsversuch 3	111
4.4	24 h Profil	113
4.5	Vorversuch	115
	Schlussbetrachtung	119
	Literaturverzeichnis.....	120
	Anhang	145
	Erklärung	149
	Lebenslauf.....	151

Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
AC	Adenylylcyclase
AD	Antidepressivum
AMP	Adenosin-Monophosphat
AMPA	<i>Amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazole-4-propionic acid</i> Glutamat Rezeptor
ATP	Adenosin-Triphosphat
AVP	Arginin-Vasopressin
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i> (Wachstumsfaktor)
BrdU	5'-Bromo-2'-desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
CA	<i>Cornu ammonis</i> (hippocampale Gehirnregion)
CaMK	Calcium-Calmodulin abhängige Kinase
cAMP	cyclisches Adenosin-Monophosphat
CREB	<i>cAMP response element-binding</i> Protein
DAB	3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride
F	Fluoxetin in Leitungswasser gelöst
FST	<i>forced-swimming</i> -Test
GABA	<i>Gamma-aminobutyric acid</i> (γ -Aminobuttersäure)
HCl	Salzsäure
HHN-Achse	Hypophysen-Hypothalamus-Nebennieren-Achse
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ISS	intrakranielle Selbststimulation
LD	Tageszyklus mit 12 Stunden <u>L</u> icht zu 12 Stunden <u>D</u> unkelheit
LL	verlängerter <u>L</u> ichtzyklus von 22 bzw. 24 Stunden <u>L</u> icht pro Tag
M	Melatonin in Leitungswasser gelöst
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MEZ	Mitteuropäische Zeit
min	Minuten
mM/l	Millimol pro Liter

N	Normal
NA	Noradrenalin
NaCl	Natriumchlorid
NE	<i>Norepinephrine</i> (Noradrenalin)
NeuN	Neuronales Nukleus Protein
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat Glutamat Rezeptor
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PDE	Phosphodiesterase
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PVN	<i>Nucleus paraventricularis</i> (hypothalamische Gehirnregion)
QTL	<i>Quantitative Trait Locus</i> (Chromosomenabschnitt)
qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
RNA	Ribonukleinsäure
Rsk	ribosomale S6 Proteinkinase
RT	Raumtemperatur
SAD	Saisonal abhängige Depression
SCN	<i>Nucleus suprachiasmaticus</i> (hypothalamische Gehirnregion)
SSC	Natriumcitrat-Kochsalzlösung
SSRI	selektiver Serotoninwiederaufnahmehemmer
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trk-B	BDNF Rezeptor
TST	<i>tail-suspension</i> -Test
ÜN	über Nacht
VGCC	<i>voltage-gated calcium channel</i> (spannungsgesteuerter Ionenkanal)
W	Leitungswasser ohne Zusatz
ZT	<i>Zeitgeber Time</i> (Zeitgeberzeit, Licht an = ZT 0)

1 Einleitung

Gefühle wie Freude, Lust und Trauer beeinflussen maßgeblich das menschliche Leben. Bedingt durch diese Empfindungen werden Emotionen hervorgerufen, Triebe gesteuert und Stimmungen ausgelöst. Euphorie, Depression und Angst sind feste Bestandteile unseres Lebens. Werden diese Stimmungen aber fehlgesteuert oder vorherrschend und anhaltend, kann sich eine affektive Störung entwickeln. Innerhalb affektiver Störungen sind depressive Erkrankungen am häufigsten vertreten (Möller *et al.*, 2009). Die Anzahl der Neuerkrankungen (*Inzidenz*) für Depression liegt bei 8-20% und das Risiko mindestens einmal im Laufe seines Lebens (Lebenszeitprävalenz) an einer depressiven Episode zu erkranken beträgt etwa 4-19% (Marneros, 2009). Nach Schätzungen der World Health Organisation (WHO) werden Depressionen bis zum Jahr 2020 den zweiten Platz nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen auf der Liste der Lebensjahre-raubenden-Krankheiten (DALYs) einnehmen. Dennoch werden depressive Erkrankungen in unserer heutigen Gesellschaft häufig tabuisiert und lassen eine Akzeptanz der Erkrankten sowie eine Transparenz der Erkrankung *per se* vermissen.

Bei der Manifestation depressiver Erkrankungen wird derzeit von einem multifaktoriellen Ansatz ausgegangen (Urani *et al.*, 2005). Genetische Prädisposition und biologische Parameter spielen dabei ebenso eine Rolle wie psychologische und psychosoziale Faktoren in Form der individuellen Lebenserfahrung (Kessler, 1997; Sullivan *et al.*, 2000). Das erbliche Risiko für Depression beträgt nach epidemiologischen Studien 40 – 50% (Fava und Kendler, 2000). Die Heredität depressiver Erkrankungen ist damit vergleichbar zu Diabetes Typ II, Bluthochdruck oder Asthma (Nestler *et al.*, 2002). Neben der genetischen Veranlagung weisen allerdings präklinische und klinische Studien inzwischen vermehrt auf einen Zusammenhang zwischen Stressexposition sowie Stressantwort und der Entstehung depressiver Erkrankungen hin (McEwen 2000, Nestler *et al.*, 2002, Caspi *et al.*, 2003; de Kloet *et al.*, 2005). Als Stressantwort wird der Zustand einer gestörten Homeostase einschließlich somatischer und mentaler Anpassungsreaktionen bezeichnet, der das ursprüngliche Gleichgewicht wieder herstellt. Komponenten, deren komplexe Interaktionen in Signalverarbeitungsprozessen der Stressbewältigung erwogen werden, sind Neurotransmitter und Neuropeptide, Elemente von Entzündungsreaktionen und Immunantwort sowie neuroendokrine und homeostatische Prozesse. Zudem gilt

Stress als kausaler Faktor von beeinträchtigten Lern- und Denkprozessen sowie Schlafstörungen, die neben anderen Beschwerden Symptome depressiver Erkrankungen sind (Hasler et al., 2004).

Die Einteilung depressiver Erkrankungen erfolgt nach Kriterien der seit Jahren etablierten Regelwerke DSM (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) und ICD (*International Classification of Diseases*). Hauptmerkmale depressiver Episoden sind eine gedrückte Stimmung oder Freudlosigkeit mit einhergehendem Interessensverlust (Anhedonie). Wenigstens eins dieser beiden Krankheitsanzeichen muss für die Diagnose mehr als zwei Wochen bestehen und zeitgleich von mindestens fünf weiteren Symptomen begleitet werden. Diese können sich in Form eines veränderten Schlafrhythmus (Hypersomnie, Insomnie), verändertem Appetit (deutliche Gewichtszunahme oder –abnahme), verringerter sexueller Motivation, Müdigkeit und Energieverlust sowie einer veränderten Psychomotorik äußern. Bei letzterer kann es sowohl zu einer Verminderung des Antriebs (Verlangsamung) als auch zu Agitation (Unruhe) kommen. Zusätzlich zur körperlichen Funktionsbeeinträchtigung prägen permanente Gefühle von Wertlosigkeit und Schuld das klinische Bild. Ebenso sind sozialer Rückzug, Konzentrationsstörungen und eine wiederkehrende Todessehnsucht auffällig. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass die mit depressiven Erkrankungen assoziierte Suizidrate mit rund 15% beziffert wird (Maris, 2002). Die Auflistung der Krankheitsanzeichen lässt unschwer erkennen, dass die Auslegungsmaßstäbe zur Krankheitsbeurteilung nicht streng definiert sind. Subjektiv-quantitative Eindrücke spielen so bei der Diagnose teilweise eine wichtigere Rolle, als es bei einer objektiv-qualitativen Einteilung wünschenswert wäre.

Trotz verschiedener klinisch effizienter Medikamente, die auf unterschiedlichen molekularen Wirkmechanismen beruhen, existiert eine große Anzahl therapieresistenter Patienten. Geringe Heilungsraten, der verzögerte Wirkbeginn der Arzneimittel sowie häufige Neben- bzw. Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten verdeutlichen die Dringlichkeit verbesserter Behandlungsmethoden. Ein detaillierteres Verständnis der Krankheitsursachen und der involvierten biologischen Mechanismen ist daher für die Diagnose und Behandlung depressiver Erkrankungen notwendig und macht die Nutzung von geeigneten, validen Tiermodellen unumgänglich.

1.1 Tiermodelle

Ein Tiermodell zu generieren, das die gesamte Symptomatik menschlicher Depression widerspiegelt, ist unmöglich. Niedergeschlagene Stimmung, ein geringes Selbstwertgefühl oder Suizidgedanken sind bei Tieren nur schwer oder gar nicht zu beurteilen - jedoch für depressive Patienten typisch. Zudem fehlt Tieren die Fähigkeit zur Selbstreflektion. Die Erforschung der Depression mit Hilfe von Tiermodellen muss sich daher auf das Messen von depressionsähnlichen Verhaltensweisen beschränken. *DSM-IV*[®] Kriterien der Depression, die bei Nagetieren untersucht werden können, sind in Anlehnung an Cryan und Mombereau (2004) in der folgenden Tabelle (Tab. 1.1) aufgelistet.

Tab. 1.1 Verhaltenskorrelate von Nagern zu den humanen *DSM-IV*[®] Depressionskriterien

Humane Depressionssymptome	Analyse im Nagermodell
<ul style="list-style-type: none"> • Depressive Gemütslage • Anhedonie Interesseverlust an vergnüglichen Aktivitäten • Änderungen im Appetit • Gewichtsänderungen • Schlafstörungen • Änderung der Psychomotorik • Müdigkeit und Energieverlust • Konzentrationsschwäche 	<ul style="list-style-type: none"> • nicht möglich • Anhedonie Reduzierte Präferenz für süße Lösungen • Bestimmung des Futterkonsums • Bestimmung des Körpergewichtes • Bestimmung mittels EEG • Aktivitätsmessung in fremder oder gewohnter Umgebung • soziale Kontaktarmut, Laufrad-Aktivität, Schwimmverhalten, Energiebedarf • Analyse des Lernverhaltens

Trotz der Schwierigkeit bei Tieren geeignete Testmethoden zur Charakterisierung humaner, affektiver Erkrankungen zu finden, sind in der Vergangenheit unzählige Versuche unternommen worden diese äußerst komplexen Mechanismen im Tiermodell zu simulieren. Die Forschung nach Tiermodellen für Depression - oder wenigstens für Kernsymptome depressiver Störungen - wird jedoch unter dem Aspekt begünstigt, dass vielzählige physiologische, endokrine und neuroanatomische Veränderungen von depressiven Erkrankungen evolutionär stabil sind. Ein nützliches Tiermodell sollte möglichst den 1969 von McKinney und Bunney vorgeschlagenen und am meisten zitierten Validitätskriterien entsprechen (McKinney und Bunney, 1969):

- die zu untersuchende Symptomatik sollte möglichst analog zur humanen Erkrankung sein (augenscheinliche Validität / Inhaltsvalidität).
- konzeptuell definierte Symptome oder Konstrukte, wie induzierte Verhaltensänderungen, sollten objektiv messbar sein (Konstruktvalidität).
- Medikamente, die pharmakologisch effektiv zur Behandlung der humanen Erkrankung genutzt werden, sollten auch beim Tier die verursachten Verhaltensauffälligkeiten normalisieren (prädiktive Validität / Kriteriumsvalidität).
- das Modell sollte in unabhängigen Experimenten mit demselben Ergebnis wiederholt werden können (Reproduzierbarkeit).

Tiermodelle für Depression wurden bereits für viele verschiedene Spezies wie Ratten, Hamster, Wühlmäuse, Spitzhörnchen oder Primaten entwickelt. Doch besonders die Möglichkeit der genetischen Manipulation rückt die Maus als Modellsystem in den Vordergrund. Zum heutigen Zeitpunkt gibt es mehr als 40 genetisch modifizierte Mauszüchtungen, die mit Depressionserkrankungen in Verbindung stehen (Cryan und Mombereau, 2004). Das ambitionierte Ziel der Mausforschung liegt darin, krankheitsrelevante Gene zu identifizieren und diese als neue Ansatzpunkte zur Verbesserung der bisherigen Therapie zu nutzen. Tiermodelle, die bei Ratten und Mäusen zum heutigen Zeitpunkt Anwendung finden, lassen sich in vier große Gruppen unterteilen: Stressmodelle, Läsionsmodelle, pharmakologische und genetische Modelle. Im Folgenden werden Modelle der einzelnen Gruppen auszugsweise angeführt.

1.1.1 Stressmodelle

Depressive Erkrankungen manifestieren sich häufig im Zusammenhang mit Stress oder traumatischen Lebensereignissen. Dies legt eine Beeinträchtigung der adäquaten Stressbewältigung bei depressiven Patienten nahe. Viele Tiermodelle zur Charakterisierung humaner depressiver Erkrankungen basieren in Anlehnung an diese Theorie auf der Exposition des Tieres gegenüber verschiedenen Arten von akuten oder chronischen Stressoren. Diese Modelle zeichnen sich durch eine gute prädikative Validität aus, da die induzierten Verhaltensänderungen sensitiv gegenüber einer antidepressiven Medikation sind.

Erlernte Hilflosigkeit

Werden Tiere wiederholt unvermeidlichen und unkontrollierbaren Fußschocks ausgesetzt, zeigen sie ein vermindertes flucht- als auch belohnungsorientiertes Verhalten, das von kognitiven Defiziten begleitet wird. Da die Verhaltensdefizite bei vorheriger Gabe verschiedener Antidepressiva ausgeglichen werden, wird dieses Phänomen im Modell der erlernten Hilflosigkeit als depressionsähnlicher Phänotyp ausgelegt. Eine Verbesserung der Symptomatik tritt üblicherweise nach einer kurzfristigen medikamentösen Behandlung im Zeitraum von Minuten bis Stunden ein. Bei Patienten verschaffen dieselben Arzneimittel allerdings erst nach chronischer Applikation Linderung. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass nicht nur Antidepressiva das Verhalten der Tiere modulieren, sondern auch andere Medikamente die Verhaltensdefizite ausgleichen können. Anxiolytika führen beispielsweise ebenso wie Antidepressiva zu einer Verbesserung der Symptomatik. Neben der kurzen Wirklatenz und der unspezifischen pharmakologischen Wirkungsweise ist zusätzlich anzumerken, dass die Verhaltensdefizite nur kurzfristig und in Kombination mit der Stresssituation nachweisbar sind. Hören die unkontrollierten Schocks für zwei bis drei Tage auf, sind keine depressiven Verhaltensmuster mehr zu erkennen (Weiss und Kilts, 1998; Cryan *et al.*, 2002). Ein weiterer Kritikpunkt an diesem Modell besteht darin, dass nicht jedes Tier in diesem Modell Verhaltensweisen der erlernten Hilflosigkeit entwickelt. Die Gründe hierfür sind bislang unbekannt. Außerdem sollte unter ethischen Gesichtspunkten das Maß der aversiven Stimulation, die einen Phänotyp induziert, kritisch betrachtet werden.

Chronischer milder Stress

Der Versuchsansatz von chronisch, mildem Stress (CMS) wurde speziell als Modell entwickelt, das sensitiv gegenüber einer chronischen Gabe von Antidepressiva ist (Willner, 2005). Zusätzlich unterstreicht dieser Ansatz den großen Einfluss von Stress im Bezug auf die Ätiologie depressiver Erkrankungen (augenscheinliche Validität). Wie der Name andeutet, werden die Versuchstiere beim CMS Modell einer Reihe von milden und unvorhersagbaren Stresssituationen für mindestens zwei Wochen ausgesetzt. Die genauen Stressprotokolle variieren je nach Labor. Sie umfassen jedoch meist Parameter wie feuchte Einstreu im Käfig, Entzug von Wasser oder Futter, Immobilitätsstress, stroboskopische Beleuchtung und Vergesellschaftung mit vielen fremden Käfigpartnern. Als Resultat dieses chronischen, milden Stressses werden langanhaltende neurochemische, neuroimmunologische und neuroendokrine Veränderungen sowie Verhaltensänderungen beschrieben (Jensberger und Richardson, 1988; Otmakhova *et al.*, 1992; Harkin *et al.*, 2003). Ebenso wird von einer progressiven Abnahme an intrakranieller Selbststimulation (ISS) und Anhedonie berichtet (Deussing, 2006). Bei ISS können die Versuchstiere eigenständig positive Gefühle über implantierte Gehirnelektroden auslösen, während Anhedonie in diesem Zusammenhang einen Rückgang der Präferenz für zuckerhaltige Lösungen beschreibt. Beide Symptome lassen Veränderungen im cerebralen Belohnungssystem vermuten. Im Einklang mit der humanpathogenen Situation können Belohnungsdefizite in beiden Parametern durch die chronische Gabe diverser Antidepressiva ausgeglichen werden, nicht aber durch deren akute Medikation. Neben ISS und Anhedonie wird in diesem Modell zusätzlich häufig das Putzverhalten der Versuchstiere untersucht (Mineur *et al.*, 2006). Dieser Parameter kann als Validitätskriterium herangezogen werden, da auch für depressive Personen die Aufrechterhaltung der Körperhygiene oft problematisch ist. Der Fellzustand der Mäuse wird mit Hilfe einer Skala von ein bis drei Punkten subjektiv bestimmt. Ein schlechter Fellzustand reflektiert in diesem Zusammenhang, zumindest bis zu einem gewissen Grad, die humanpathogene Situation. Die Aussagefähigkeit dieses Parameters wird jedoch kontrovers diskutiert.

Trotz der besonders großen augenscheinlichen Übereinstimmung mit der humanpathogenen Situation, liegt ein großer Nachteil des CMS Modells in seiner schlechten Reproduzierbarkeit. Selbst bei Verwendung eines bereits erprobten Stressprotokolls ist es oft nicht möglich das Modell erfolgreich in verschiedenen Laboren zu etablieren.

Sozialer Stress

Menschen, die soziale Ablehnung erfahren, weisen vermehrt Anzeichen von Angst, Vereinsamung und ein geringes Selbstwertgefühl auf (Brown, 1993). Sozialer Stress ist dabei nicht nur auf den Menschen limitiert, sondern findet sich speziesübergreifend bei allen höheren, in Gruppen lebenden Tieren (Kudryavtseva und Avgustinovich, 1998; Fuchs und Flügge, 2002). In sozialen Stressmodellen werden deshalb Versuchstiere entweder wiederholt einem dominanten und aggressiven Artgenossen ausgesetzt („*resident-intuder*“ Modell) oder das sie umgebende, soziale Gefüge wird zerstört („*group social stress*“ Modell). Diese Prozedur kann mit oder ohne physischem Kontakt erfolgen. Als Konsequenz wird jedoch stets ein gegenüber Antidepressiva sensitives, komplexes Syndrom induziert. Charakteristisch sind Veränderungen im kardiovaskulären und neuroendokrinen System sowie Anhedonie.

Frühkindlicher Stress

Negative Erfahrungen in der frühen Kindheit, wie z.B. traumatische Erlebnisse, führen zu einer erhöhten Stressempfindlichkeit im späteren Leben sowie einem gesteigerten Risiko für psychiatrische Erkrankungen. Im Nagermodell des frühkindlichen Stresses wird daher die biologische Konsequenz von einer postnatalen Mutter-Kind Trennung (maternale Deprivation) untersucht. Variiert werden die Protokolle je nach Dauer, Häufigkeit, Tageszeit, verwendeter Zuchtlinie oder dem Alter der Versuchstiere. Bedingt durch die Trennung kommt es als Folge zu Verhaltensauffälligkeiten und neuroendokrinen Veränderungen, die bis in das Erwachsenenalter des Tieres anhalten. Bei adulten Versuchstieren ist beispielsweise eine gesteigerte Aktivität der Stress-Achse festzustellen, die von einem depressionsähnlichen Verhalten und einer gesteigerten Angst begleitet wird (Penke *et al.*, 2001, Plotsky *et al.*, 2005). Als Ursache für die messbaren Effekte wird eine veränderte Qualität der mütterlichen Sorge um den Nachwuchs nach der Trennungsphase diskutiert. Obwohl die genauen Prozesse maternaler Deprivation unbekannt sind, bietet dieses Modell eine gute Möglichkeit, die neurobiologische Basis von frühkindlichem Stress im Bezug auf Verhaltensänderungen im Erwachsenenalter zu untersuchen. Besonders die Option, Interaktionen des genetischen Hintergrundes mit der jeweiligen Umwelt zu untersuchen, macht dieses Mausmodell interessant. Wichtig zu bemerken ist jedoch, dass eine Stressdauer kürzer als zwei Wochen in einem depressionsresistenten Phänotyp resultiert.

1.1.2 Läsionsmodelle

Läsionsmodelle basieren auf der Annahme, dass Depressionen durch regulatorische Defizite in neuronalen Schaltkreisen verursacht werden. Die operative, beidseitige Entfernung des *Bulbus olfactorius*, führt zu einer Zerstörung der limbisch-hypothalamischen Achse. Daraus resultiert eine Reihe von langanhaltenden Verhaltensänderungen, die mit einer depressiven Symptomatik in Verbindung gebracht werden. Dokumentierte Merkmale bei bulbektomierten Nagern sind Anhedonie (Cryan und Mombereau, 2004; Anisman und Matheson, 2005), Hyperaktivität im Offinfeld (Zueger *et al.*, 2005), Verminderung des räumlichen Lernvermögens, Veränderungen in futtermotivierten Verhalten sowie Defizite im passiven Vermeidungslernen (Kelly *et al.*, 1997). Wegen der auffälligen Hyperaktivität wird bei diesem Modell von einer agitierten, hyposerotonergen, depressionsähnlichen Symptomatik gesprochen. Dieser Phänotyp steht damit im Gegensatz zu der Verlangsamung von Bewegungsabläufen (Retardierung), die häufig im Zusammenhang mit stressinduzierten Depressionsmodellen beschrieben wird. Da die Wirkung applizierter Antidepressiva verzögert eintritt, besitzt dieses Modell eine gute augenscheinliche und prädikative Validität (Porsolt, 2000). Der Verlust des Geruchsinnes wird als Ursache für die zu messenden Verhaltensauffälligkeiten ausgeschlossen, da ein vergleichbares Syndrom durch periphere Anosmie nicht generiert wird. Als Basis des detektierten Phänotyps werden vielmehr kompensatorische Mechanismen und neuronale Reorganisation angenommen. Im Einklang mit dieser Annahme sind Veränderungen der synaptischen Plastizität in verschiedenen limbischen Gehirnarealen wie der Amygdala und dem Hippocampus belegt (Grecksch *et al.*, 1997; Norrholm und Ouimet, 2001). Ferner weisen Modulationen in serotonergen, cholinergen, GABAergen und glutamatergen Transmittersystemen auf Parallelen zur humanpathogenen Situation hin (Kelley *et al.*, 1997; Song und Leonard 2005). Zudem sind sowohl für depressive Personen als auch für bulbektomierte Nager erhöhte Glucocorticoidwerte charakteristisch, die bei beiden durch Antidepressiva normalisiert werden können (Otmakhova *et al.*, 1992, Kelly *et al.*, 1997).

Ein großer Nachteil bei dem Modell der Bulbektomie besteht jedoch darin, dass ein operativer Eingriff benötigt wird. Bedingt durch diese invasive Vorgehensweise werden viele zusätzliche Variablen verursacht, die ebenfalls als Auslöser der depressionsähnlichen Symptomatik in Erwägung gezogen werden müssen.

1.1.3 Pharmakologische Modelle

Eine mögliche Korrelation von pharmakologisch aktiven Substanzen und Depressionserkrankungen wurde erstmals in den frühen 50er Jahren in Betracht gezogen. Bluthochdruckpatienten, die mit dem Medikament Reserpin behandelt wurden, erlitten in 15% der Fälle eine schwere Depression als Nebenwirkung (Freis 1954). Bei Nagern wird nach Reserpin-Applikation lokomotorische Hypoaktivität und eine reduzierte Körpertemperatur dokumentiert. Beide Symptome sind durch die medikamentöse Verringerung des Monoaminspiegels bedingt. Da Antidepressiva die induzierten Reserpineffekte kompensieren, werden die Auffälligkeiten als depressionsähnlicher Phänotyp interpretiert (Grattini *et al.*, 1962; Nakamura und Fukushima 1976). Vergleichbare depressive Symptome können neben Reserpin auch durch den Entzug von psychostimulierenden Substanzen erzeugt werden. Kokainentzug führt bei Nagern, neben anderen depressiven Symptomen, zusätzlich zu einer erhöhten Schwelle im cerebralen Belohnungssystem. Damit weist diese Vorgehensweise Parallelen zu humanen Entzugsphasen auf, die typischerweise von Interesseverlust und einem verminderten Empfinden von Freude geprägt sind. Pharmakologische Entzugsmodelle, die einen niedergeschlagenen, depressiven Phänotyp beim Versuchstier induzieren, besitzen somit eine hohe augenscheinliche Validität. Ferner kann mit Hilfe dieser Modelle die Wirksamkeit antidepressiver Medikamente getestet werden und auch die induzierte Depressionssymptomatik selbst untersucht werden. Zu erwähnen ist allerdings, dass diese pharmakologischen Modelle keine Kernsymptome depressiver Erkrankungen abbilden.

1.1.4 Genetische Modelle

Diverse Tiermodelle der Depression wurden während der letzten Jahrzehnte mit Hilfe von selektiven Züchtungen entwickelt. Bekannte Beispiele dieser Strategie sind die Rouen-depressiven-Mäuse oder die Flinders-sensitiven-Ratten (El Yacoubi und Vaugeois, 2007). Des Weiteren stehen im Bereich der Genetik Modelle zur Verfügung, die durch konditionale Regulierung spezieller Gene Phänotypen sensibler oder resistenter machen können. Das große Ziel dieser Forschung besteht zum einen darin, die genetische Grundlage zur Entstehung depressiver Erkrankungen zu bestimmen, zum anderen mit Hilfe genetischer Manipulation die klinischen Erwartungen und Anforderungen besser zu erfüllen.

1.1.5 Methoden zur Charakterisierung antidepressiver Substanzen

Nicht zu verwechseln sind die bereits angeführten Modelle mit so genannten „Screening-Tests“. Zu diesen Tests zählen der „*forced-swimming*“-Test (FST) (Porsolt *et al.*, 1977) und der „*tail-suspension*“-Test (TST) (Steru *et al.*, 1985). Beide Versuchsprotokolle basieren auf der Annahme, dass einem Tier zwei Verhaltensalternativen in einer ausweglosen Situation zur Verfügung stehen. Zum einen besteht für das Tier die Möglichkeit, sich aktiv aus der bestehenden Situation zu befreien, zum anderen das passive Ertragen der Situation und das Aufgeben jeglicher Befreiungsversuche. Eine geringe Motivation sich zu befreien, resultiert in einer hohen Immobilität. Diese wird als depressiver Phänotyp eingestuft, weil die Gabe antidepressiver Medikamente zu einer Steigerung der Aktivität führt (Cryan und Mombereau, 2004). Nach Willner (1990) spiegelt das immobile Verhalten die mangelnde Bereitschaft des Tieres wieder, sich nachhaltig aus der Situation zu befreien und korreliert mit der psychomotorischen Beeinträchtigung depressiver Patienten. Begründet wird diese Annahme dadurch, dass depressive Personen Defizite in Tests aufweisen, die eine kontinuierliche Bereitschaft zum Lösen einer Aufgabe voraussetzen (Weingartner und Silberman, 1982).

Um neue Antidepressiva für klinische Anwendungen auszuwählen, hat sich insbesondere der FST durchgesetzt. Während die antidepressive Wirkung potentieller Medikamente im FST bereits nach akuter Gabe eintritt, beträgt die klinische Latenzzeit der gleichen Medikamente mehrere Wochen. Zudem sprechen etwa zwei Drittel der depressiven Patienten nicht auf ihre erste medikamentöse Therapie an, obwohl die verordneten Medikamente antidepressive Eigenschaften im FST aufweisen. Ein weiterer Nachteil dieser Testmethode besteht darin, dass Antidepressiva bei erkrankten Personen stimmungsaufhellende Effekte erzielen, während keine Wirkung bei gesunden Personen erkennbar ist - im FST wird die Wirksamkeit potentieller Medikamente jedoch an gesunden Mäusen bewertet. Ferner sind mit Hilfe dieser Testmethode bis heute keine Antidepressiva auf den Markt gekommen, die auf innovativen Wirkmechanismen beruhen.

Als weiterer Kritikpunkt bleibt die Frage, inwieweit alle bisherigen Tiermodelle der Depression tatsächlich sensitiv gegenüber einem stimmungsaufhellenden Effekt im Gehirn sind, oder ob sie lediglich andere Mechanismen beschreiben.

1.2 Hypothesen zur Depression

Neben der häufig geäußerten Kritik an der Verwendung von Tiermodellen für depressive Erkrankungen, haben aber gerade diese Modelle zu einer Reihe aktueller und populärer Hypothesen geführt. Diese postulierten Ansätze versuchen unter Berücksichtigung neuer Aspekte das Auftreten depressiver Erkrankungen sowie die Wirkungsweise antidepressiver Medikamente zu erklären. Beeinträchtigungen neurotrophischer Mechanismen und Fehlsteuerungen der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HHN-Achse) ergänzen inzwischen als zwei moderne Konzepte die weit verbreitete Theorie der Monoamin-Mangel-Hypothese (Urani *et al.*, 2005).

1.2.1 Monoamin-Mangel-Hypothese

Die Monoamin-Mangel-Hypothese stützt sich auf klinische Befunde der 1950er Jahre, die erstmalig stimmungsaufhellende bzw. depressive Effekte als Nebenwirkung bei der Behandlung von Tuberkulose- und Bluthochdruckpatienten dokumentieren. Da die angewandten Medikamente die Konzentration der Monoamine in den Nervenzellen pharmakologisch verändern, postulierte Josef J. Schildkraut 1965, dass die biochemische Grundlage depressiver Zustände auf einem Mangel des Monoamins Noradrenalin beruht (Schildkraut, 1965). Alec Coppen erweiterte diese Annahme 1967 mit der These, dass die Erschöpfung des Neurotransmitters Serotonin ursächlich für das Absinken des Noradrenalingehaltes sei (Coppen, 1967). Die Entdeckung der aktuell angewendeten Therapeutika für depressive Erkrankungen beruht also eher auf einem glücklichen Zufall, als auf zielgerichteter Arzneimittelforschung. Die Beteiligung des Serotonin-Transmittersystems an depressiven Erkrankungen wird jedoch durch mehrere Studien untermauert: Erniedrigte Werte des Serotoninmetaboliten Hydroxyindolessigsäure (HIAA /HIES) werden in Cerebrospinalflüssigkeit und Plasma depressiver Patienten und besonders von Selbstmordkandidaten gefunden (Roy *et al.*, 1989; Mann, 1999; Elhwuegi, 2004). Zudem belegen *post mortem* Untersuchungen an Gehirngewebe depressiver Personen verminderte Bindungseigenschaften des Serotonin-Transporters (Maes und Meltzer, 1995). Ferner ist eine kurzfristige, diätbedingte Erniedrigung des Serotoninvorläufers Tryptophan in der Lage bei depressiven Patienten das erneute Ausbrechen der Krankheit zu induzieren (Heninger *et al.*, 1996; Delgado *et al.*, 1999). Ein weiteres Indiz für die Beteiligung der Monoamine im Zusammenhang mit Depressionserkrankungen ist, dass mit Hilfe des serotonergen Neurotransmittersystems physiologische Funktionen moduliert werden,

die bei depressiven Patienten fehlgesteuert sind. Neben der Modulation affektiver Reaktionen in limbischen Gehirnbereichen, ist Serotonin an der Steuerung von Schlaf, Appetit, Erinnerung und Lernprozessen beteiligt. Interessanterweise wird die Aktivität serotonerger Neurone teilweise von noradrenergen Projektionen des *Locus caeruleus* kontrolliert (Baraban und Aghajanian, 1981; Törk, 1990). Eine Beeinträchtigung beider Neurotransmittersysteme kann demnach mit dem Auftreten depressiver Erkrankungen assoziiert werden. Es ist daher nicht verwunderlich, dass die Wirkung aller heute gängigen Antidepressiva auf der Modulation des serotonergen und noradrenergen Systems beruht (Holsboer 2000; Manji *et al.*, 2001).

Neben einer verminderten Aktivität werden Depressionen jedoch auch mit einer erhöhten Aktivität des noradrenergen Systems in Verbindung gebracht (Mongeau *et al.*, 1997, Ressler und Nemeroff 2000). Gesteigerte Werte von sekretiertem Noradrenalin in Cerebrospinalflüssigkeit und Plasma sind für Patienten nachgewiesen, die an unipolarer Depression und Angstzuständen leiden. (Roy *et al.*, 1988; Sevy *et al.*, 1989). Ebenfalls belegen *post mortem* Studien einen Anstieg der alpha 2- und beta-Noradrenalinrezeptoren im Gehirngewebe depressiver Personen (Mann *et al.*, 1986, Meana *et al.*, 1992). Diese Befunde legen eine Dysregulation im noradrenergen Neurotransmittersystem und eine mögliche Hypersensitivität noradrenerger Rezeptoren nahe (Siever und Davis, 1985). Bei depressiven Personen scheint demnach unter basalen Bedingungen die noradrenerge Neurotransmission erniedrigt zu sein, während sie - bedingt durch die Rezeptorhypersensitivität- unter Stress abnormal ansteigt (Ressler und Nemeroff, 2000; Harro und Orelund, 2001).

Ein wichtiger Einwand gegen die Monoamin-Mangel-Hypothese ist allerdings in der großen Anzahl therapieresistenter Patienten (Urani *et al.*, 2005) und der Wirklatenz antidepressiver Substanzen zu sehen (Mitchell, 2006). Auf zellulärer Ebene wirken Antidepressiva innerhalb von Minuten nach Verabreichung, indem sie die Quantität der Neurotransmitter erhöhen. Ihr therapeutischer Nutzen bei der Behandlung von Depressionserkrankungen setzt allerdings erst verzögert nach Tagen bis Wochen ein. Diese Befunde legen nahe, dass die Modulation der Neurotransmitter lediglich der initiale Schritt für weiterführende und langsamer ablaufende Mechanismen ist. Neuere Hypothesen der Depressionsentstehung fokussieren daher vermehrt auf *Second-Messenger* Signalkaskaden, die Langzeit-Veränderungen der Genexpression auslösen und an der Vermittlung von antidepressiven Effekten beteiligt sind.

1.2.2 Neurotrophin-Hypothese

Ein wichtiges *Second-Messenger* System, dass durch Antidepressiva induziert werden kann, ist der Signalweg des cyclischen Adenosin-Monophosphats (cAMP) (Vaidya und Duman, 2001) (Abb. 1.3). Die Bildung von cAMP führt zur Initiierung der cAMP abhängigen Proteinkinase (PKA), die wiederum durch Phosphorylierung das cAMP-*response-element-binding* (CREB) Protein aktiviert. Phosphoryliert ist CREB in der Lage die Transkription vieler verschiedener Gene zu aktivieren. Zu diesen Zielsequenzen gehört das *bdnf*-Gen, wie in *vitro* und in *vivo* Versuche zeigen (Tao *et al.*, 1998; Conti *et al.*, 2002). Dieses codiert für den Wachstumsfaktor BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*). Seinen anti-apoptotischen Effekt übt BDNF hauptsächlich durch Bindung an seinen Rezeptor, die Tyrosinkinase Typ B (TrkB) aus. Ferner ist BDNF neben anderen neurotrophischen Faktoren für die neuronale Plastizität des Gehirns wichtig. Neuronale Plastizität beschreibt dabei die Fähigkeit des Gehirns, sich funktionell und strukturell an interne oder externe Stimuli anzupassen. Dies erfolgt durch Modulation synaptischer Übertragung oder durch Neubildung von Nervenzellen (Neurogenese).

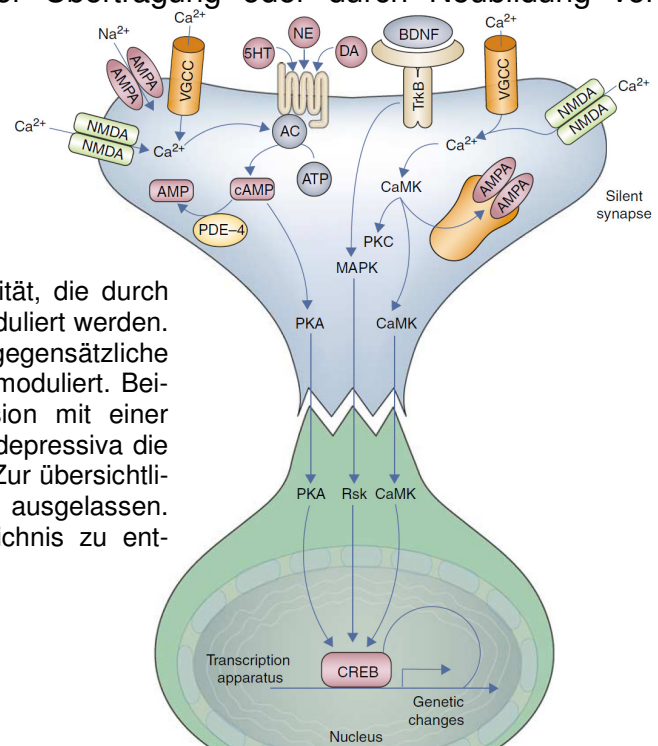


Abb. 1.3 Neuronale Plastizität

Molekulare Signalwege neuronaler Plastizität, die durch Stress, Depression und Antidepressiva moduliert werden. Viele dieser Signalkaskaden werden in gegensätzliche Richtungen durch Stress und Depression moduliert. Beispielsweise werden Stress und Depression mit einer Reduktion an CREB assoziiert, wobei Antidepressiva die CREB Aktivität im Hippocampus steigern. Zur übersichtlichen Darstellung sind bestimmte Details ausgelassen. Abkürzungen sind dem Abkürzungsverzeichnis zu entnehmen.

Nach Pittenger und Duman, 2008

Neurogenese kommt im adulten Zentralnervensystem (ZNS) der Säugetiere einschließlich des Menschen nur in bestimmten Regionen vor (Lie *et al.*, 2004, Ming und Song 2005). Diese Regionen umfassen das Striatum, den Neokortex, die subventrikuläre Zone (SVZ) in der Lateralwand des Seitenventrikels und den *Gyrus dentatus* im Hippocampus (Taupin und Gage, 2002; Gould und Gross, 2002). Proliferierende Stammzellen im *Gyrus dentatus* befinden sich in der subgranulären Zone (SGZ) und

wandern in die angrenzende Körnerzellschicht ein. Etwa 50% der eingewanderten Zellen überlebt und differenziert in der Körnerzellschicht in Neurone (75 – 80%) und Gliazellen (10 – 15%), neben einem Anteil der undeterminiert bleibt (Duman *et al.*, 2001). Von der ersten Zellteilung bis zur funktionellen Integration der Zelle dauert es bei Säugetieren ca. 4 - 7 Wochen (van Praag *et al.*, 2002; Jessberger und Kempermann, 2003). Der gesamte Prozess der Neurogenese kann in fünf Entwicklungsstadien unterteilt werden: Proliferation, Differenzierung, Migration, Axon- und Dendritenbildung sowie synaptische Integration (Kempermann *et al.*, 2003). Jedes dieser Stadien ist durch eine spezielle Zellmorphologie, Proliferationsfähigkeit sowie Expression histologischer Marker gekennzeichnet. Mittels immunreaktiver Nachweismethoden für Nestin, GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), DCX (*doublecortin*), Calretinin, Calbindin und NeuN (*neuronal nuclei antigen*) ist eine Charakterisierung der neu gebildeten Zellen leicht möglich. Gerade der postmitotische, neuronale Marker NeuN wird in diesem Zusammenhang am häufigsten verwendet, um ausgereifte Neurone zu identifizieren (Kempermann *et al.*, 2004).

Die Proliferation neuraler Stammzellen kann auf molekularer Ebene durch verschiedene neurotrophische Faktoren beeinflusst werden. Zu diesen zählen beta-Endorphin, der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), BDNF und auch Serotonin. Eine direkte Applikation von BDNF in die Region des *Gyrus dentatus* führt bei Ratten zu einem Verhaltensphänotyp, der einer antidepressiven Behandlung ähnelt (Shirayama *et al.*, 2002). Immobilisationsstress führt dagegen zu einer Reduktion der hippocampalen BDNF-mRNA, die durch Gabe antidepressiv wirkender Substanzen verhindert wird (Nibuya *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995). Verminderte Mengen an BDNF im Vergleich zu Kontrolltieren sind zudem auch in verschiedenen Gehirnarealen für Flinders-sensitive-Ratten belegt, die als genetisches Depressionsmodell etabliert wurden (Angelucci *et al.*, 2000). In Übereinstimmung mit diesen Befunden erhöhen Antidepressiva den Anteil von BDNF in depressionsassoziierten Gehirnarealen. Als Therapeutikum eignet sich BDNF jedoch nicht. Mit einer Molekülgröße von 13 kDa ist es zu groß, um die Blut-Hirn-Schranke zu passieren und seine Wirkung auf Neurone zu entfalten. Neben BDNF aktivieren antidepressiv wirkende Medikamente jedoch auch CREB in depressionsassoziierten Gehirnregionen. Depressive Erkrankungen werden deshalb mit einer verminderten Aktivität des CREB-BDNF-TrkB Signalwegs assoziiert. Unterstützt wird diese Theorie, da für depressive Patienten als Folge von chronischem Stress erhöhte Werte von Glucocorticoiden im Plasma do-

kumentiert sind, die ebenfalls eine Verminderung hippocampaler BDNF-mRNA verursachen (Holsboer, 2001).

Zahlreiche andere Studien lassen die Involvierung neurotrophischer Faktoren bei der Entstehung depressiver Erkrankungen jedoch fraglich erscheinen. Beispielsweise existieren Berichte, die stressbedingte Veränderungen in pyramidalen Dendriten der CA3 Region im Hippocampus belegen, die zwar durch antidepressiv wirkende Medikamente, nicht aber durch einen BDNF abhängigen Mechanismus beeinflusst werden (Kuroda und McEwen, 1998). Auch sprechen CREB defiziente Mäuse auf Antidepressiva in Depressionstests an, obwohl sie nicht die CREB-BDNF-TrkB Signalkaskade aktivieren können (Conti *et al.*, 2002). Ferner weisen Mäuse, bei denen das *bdnf*-Gen konditional ausgeschaltet wurde, statt einem depressiven Syndrom eher einen ängstlich, adipösen Phänotyp auf (Rios *et al.*, 2001). Diese widersprüchlichen Resultate betonen erneut die derzeit begrenzten Möglichkeiten zur Erforschung depressiver Erkrankungen. Gleichzeitig stellen sie die Notwendigkeit an zusätzlichen, experimentellen Instrumenten heraus, um Ursache und Wirkung depressionsassoziierter Faktoren - wie beispielsweise BDNF und Stress- zu untersuchen.

1.2.3 Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Hypothese

Chronischer Stress wirkt vielseitig auf das zentrale Nervensystem und beeinflusst neuronale Plastizität in verschiedenen Gehirnregionen, die bei depressiven Patienten funktionelle Störungen aufweisen (Pittenger und Duman, 2008). Bedingt durch die klinische Beziehung von Stress und Depression, stellen Stresssignalkaskaden und die darin beteiligten Mechanismen potentielle Kandidaten zur Erforschung depressiver Erkrankungen dar.

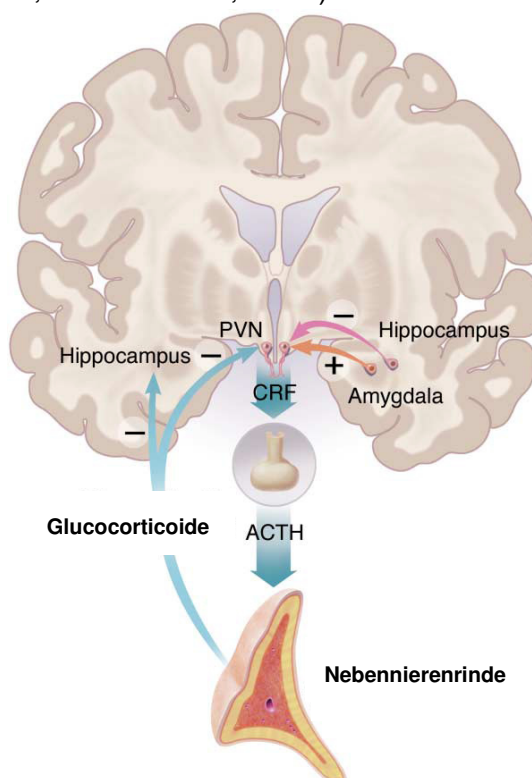
Der zentrale, neuroendokrine Signalweg zur Vermittlung von Stress erfolgt bei allen Säugetieren über die Aktivierung der Hypophysen-Hypothalamus-Nebennieren- (HHN-) Achse. Durch Aktivierung der HHN-Achse und der damit verbundenen Ausschüttung von Glucocorticoiden soll das Überleben des Organismus in kritischen und lebensbedrohlichen Situationen gewährleistet werden. Nach Ausschüttung der Glucocorticoide und Bindung an nukleäre Rezeptoren (Mineralocorticoid- und Glucocorticoidrezeptoren) in verschiedenen Organen werden Genexpression, Metabolismus und Verhalten moduliert. Es kommt zu einer Verstärkung der Gluconeogenese, Lipolyse, Proteolyse und Insulinresistenz, sowie zu erhöhtem Blutdruck, gesteigerten Blutzuckerwerten, einer erhöhten Atem- und Pulsfrequenz. Alle diese Mechanismen

führen zu einer gesteigerten Leistungsfähigkeit der Herz- und Skelettmuskulatur sowie einer erhöhten Aufmerksamkeit (Holsboer, 1999). Im Gehirn weisen sowohl die Mineralocorticoid- als auch die Glucocorticoidrezeptoren eine spezifische und selektive Verteilung auf, die wichtig zur Induktion der jeweiligen Prozesse ist (Reul und de Kloet, 1985). Als Reaktion auf interne und externe Stressoren sezernieren die parvocellulären Neurone des paraventriculären Nukleus im Hypothalamus (PVN) das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH). Die Wirkung von CRH wird im ZNS durch zwei Typen von stimulatorischen G-Protein gekoppelten Rezeptoren vermittelt, dem CRH Rezeptor 1 und dem CRH Rezeptor 2. Nach Bindung von CRH an die CRH Rezeptoren der Adenohypophyse stimuliert das Peptidhormon die Synthese und Freisetzung des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) und die von beta-Endorphin. Dieser Effekt wird durch die simultane Ausschüttung von Arginin-Vasopressin (AVP) aus den parvocellulären Neuronen des PVN um ein vielfaches potenziert. Das ausgeschüttete, glandotrope ACTH gelangt über den Blutkreislauf zur Nebenniere. Dort fördert es die Synthese und Freisetzung der Glucocorticoide, Cortisol beim Menschen und Corticosteron bei Nagern. Die ausgeschütteten Glucocorticoide lösen durch Rezeptorbindung ein negatives Rückkopplungssignal in den Regionen der Hypophyse und des Hypothalamus aus. Die Konzentration der Glucocorticoide wird reduziert und die Stressantwort terminiert. Da viele depressive Patienten Fehlregulierungen in der Ausschüttung von Cortisol und signifikant erhöhte Cortisolwerte im Blut aufweisen, wird eine Dysregulation der HHN-Achse als kausaler Faktor depressiver Erkrankungen diskutiert (Nemeroff, 1988; Salpolsky, 2000; Nestler *et al.*, 2002).

Abb. 1.3 HHN Achse

Das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) wird vom paraventriculären Nukleus (PVN) in das Portaladergefäßsystem abgegeben. Nach Bindung an den CRH Rezeptor stimuliert es die Synthese des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) in den Zellen des Hypophysenvorderlappens. ACTH selbst wirkt auf die Zellen der Nebennierenrinde, die daraufhin Glucocorticoide sezernieren. Diese wiederum üben eine negative Rückkopplung nach Bindung an den Glucocorticoidrezeptor aus. Neben dem Hippocampus wirkt auch die Amygdala modulierend auf die CRH Sekretion, wobei die Effekte antagonistisch sind.

Nach Nestler *et al.*, 2002



Unterstützt wird diese Annahme, da sich erhöhte Cortisolwerte unter antidepressiver Therapie normalisieren oder auch spontan reduzieren, sofern die depressive Episode überstanden ist (Wolkowitz *et al.*, 1993). Zudem belegen erste klinische Studien antidepressive Eigenschaften von Antagonisten der Glucocorticoidrezeptoren, wie Mifepriston (RU486) (Gallagher und Young, 2006). Im Einklang mit diesen Befunden legen verschiedene tierexperimentelle Studien eine fehlerhafte Regulation der HHN-Achse bei der Pathogenese depressiver Erkrankungen nahe. Eine ungebremste Sekretion von CRH im ZNS führt beispielsweise zu einem depressions- und angstähnlichen Phänotyp, der durch die kontinuierliche Aktivität des CRH Rezeptors vermittelt wird. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen resultiert die intracerebroventriculäre Injektion von CRH in einem gesteigerten Aktivierungszustand (*arousal*) begleitet von angstähnlichem Verhalten. Auch zeichnen sich CRF Rezeptor 1 Antagonisten in Nagern Modellen der stressbedingten Depression durch einen antidepressiven Effekt aus. Da bei der Sekretion von CRH aus hypothalamischen Neuronen jedoch auch eine Reihe anderer Neurotransmittersysteme beteiligt sind, die via Acetylcholin, Dopamin, Noradrenalin und Serotonin agieren und weitere Gehirnregionen involvieren, sollte im Bezug auf die Therapiemöglichkeit depressiver Erkrankungen eine Inhibierung des CRF Systems außerhalb des PVNs ebenfalls erwogen werden. Potentielle weitere Regionen für antidepressive Wirkmechanismen stellen Hippocampus, Amygdala und Kortex dar. Diese Regionen agieren miteinander und in Wechselwirkung mit dem PVN über diverse Rückkopplungssignalwege. Der Hippocampus inhibiert dabei die Ausschüttung von CRH im PVN, während die Amygdala excitatorisch auf die CRH Sekretion des PVN wirkt (Gray, 1993; Weidenfeld *et al.*, 1997).

Wie die Ausführungen der einzelnen Depressions-Hypothesen erkennen lassen, sind überlappende Erklärungsansätze aber auch zahlreiche, widersprüchliche Resultate im Bezug zur Ätiologie depressiver Erkrankungen zu finden. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen mag durch das heterogene Krankheitsbild und die jeweilige Konstellation verschiedener Faktoren bedingt sein, die gemeinsam zu dem kategorisierten Phänotyp „Depression“ führen. Zur besseren Erforschung depressiver Erkrankungen sind daher Tiermodelle sinnvoll, die den Fokus auf einen speziellen Subtyp der Depression legen. Bei den aktuell verwendeten Tiermodellen der Depression ist dies jedoch nicht der Fall.

1.3 Saisonal abhängige Depression

Ein besonderer Subtyp der Depression ist die saisonal abhängige Depression (SAD). Diese Sonderform tritt unter den depressiven Patienten zu etwa 20% auf (Betrus und Elmore, 1991). SAD ist geprägt von jährlich wiederkehrenden depressiven Episoden, die sich typischerweise in den Herbst- und Wintermonaten manifestieren. Einen Zusammenhang von SAD mit den sich jahreszeitlich verändernden Sonnenlichtverhältnissen wird vermutet. Unterstützt wird diese These mit der Prävalenz für SAD-Erkrankungen. Diese nimmt mit steigenden nördlichen Breitengraden zu, in denen die Anzahl der Sonnenstunden pro Tag während des Winters deutlich verringert ist (Birtwistle und Martin, 1999). Die diagnostischen Kriterien für SAD-Patienten sind die allgemein kategorisierten Depressionssymptome nach ICD-10 und DSM-IV. Da bei SAD-Kranken jedoch hauptsächlich atypische Symptome, wie Hypersomnie, stark belastende Müdigkeit, Gewichtszunahme und Teilnahmslosigkeit auftreten, wird SAD als atypische Depression oder als eine Depression mit atypischem Verlauf beschrieben (Kasper, 1994; Partonen und Lonnqvist, 1998; Gold und Chrousos, 2002). Eine spezielle, diagnostische Kategorie sieht das ICD-10 für SAD-Patienten allerdings nicht vor. Behandelt wird SAD durch die von N. E. Rosenthal in den achtziger Jahren eingeführt Lichttherapie (Rosenthal *et al.*, 1984). Vollspektrales Licht wird alleine oder in pharmakologischer Kombination angewendet. Die Wertigkeit der Lichttherapie wird kontrovers diskutiert, obwohl Therapieerfolge bereits belegt sind. Diese dokumentieren eine Synchronisierung biologischer Rhythmen (*Entrainment*), die von einer intensivierten Serotonintransmission begleitet wird (Birtwistle und Martin, 1999). Da eingesetzte Antidepressiva vom Typ der selektiven Serotoninwiederaufnahmehemmer (SSRIs) die Beschwerden von SAD-Patienten lindern, wird eine Störung im Serotoninhaushalt als wahrscheinlich erachtet (Birtwistle und Martin, 1999). Die genaue Ätiologie und Pathophysiologie von SAD sind allerdings bis heute nicht verstanden. Zurzeit existieren verschiedene Theorien, nach denen SAD im Zusammenhang mit Sonnenlichtverhältnissen, Melatonin, Hormonfehlsteuerungen oder Veränderungen der circadianen Rhythmen gesehen wird.

Veränderungen der circadianen Rhythmik werden stark mit dem Auftreten von Depressionen assoziiert. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass depressive Patienten häufig unter einem gestörten Schlaf-Wach-Zyklus, hormonellen Schwankungen, Veränderungen der Thermoregulation und des Appetits sowie Konzentrations-

und Aufmerksamkeitsschwäche leiden, die alle tageszeitlichen Schwankungen unterliegen (Bunney und Bunney, 2000). Zudem scheint fast jede erfolgreiche Therapie depressiver Erkrankungen die circadiane Rhythmik der Betroffenen zu beeinflussen. Veränderungen, Resynchronisation oder Stabilisierung dieser Rhythmik scheinen demnach wichtig für einen Therapieerfolg zu sein (McClung, 2007). Bei Säugetieren, vor allem der Maus, sind zahlreiche Gene beschrieben, die mit einer circadianen Rhythmik assoziiert werden. Zu diesen Genen gehören u. a. *CRY* (*Cryptochrome*), *CLOCK* (*Circadian locomotor output cycles kaput*), *BMAL1* (*brain and muscle, ARNT-like 1*), *PER1* bis *3* (*Period 1* bis *3*), *AVP* (*Arginine vasopressin*) und *NPAS2* (*Neuronal PAS domäne Protein 2*). Sie alle steuern in komplexer Wechselwirkung Transkription und Translation autoregulatorischer Rückkopplungsschleifen, die recht genau 24 Stunden in Anspruch nehmen. Ein Polymorphismus im *NPAS2* Gen wird speziell mit dem Auftreten von SAD assoziiert (Johansson *et al.*, 2003).

Endogen wird der circadiane Rhythmus über ein Kerngebiet des Hypothalamus gesteuert, dem so genannten suprachiasmatischen Nukleus (SCN). Der SCN erhält Lichtinformationen von der Retina über den retino-hypothalamischen Trakt (Abb.1.4). AVP-haltige Schrittmacherneurone des SCN projizieren zum parvozellulären dorsalen Bereich des paraventriculären Nukleus (PVN) (Klein *et al.*, 1983). Vom PVN gelangen Fasern zum *Nukleus intermedius* des Rückenmarks (IMC; C8), von dem aus das *Ganglion cervicale superior* (SCG) innerviert wird (Brown, 1994). Durch Ausschüttung von Noradrenalin aus den Synapsen der postganglionären Nerven werden adrenerge Rezeptoren der Pinealozyten aktiviert. Es kommt zur Ausschüttung von Melatonin in den Blutkreislauf.

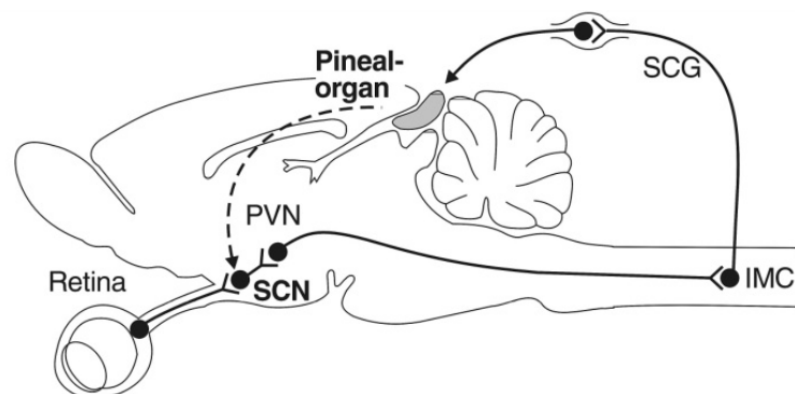


Abb. 1.4 Das circadiane System der Maus

Von der Retina gelangt die Lichtinformation über den retino-hypothalamischen Trakt zum SCN (*Nukleus suprachiasmaticus*). Dieser innerviert den PVN (*Nukleus paraventricularis* des Hypothalamus), der die Information an den IMC (*Colliculus intermedio-lateralis*) und das SCG (*Ganglion cervicale superior*) weiterleitet. Efferente Bahnen des SCG innervieren die Melanozyten des Pinealorgans. Es kommt zur Inhibition der Melatoninausschüttung.

Nach Richter *et al.*, 2004

Eine herabgesetzte Funktionsweise des SCN wird durch einen erhöhten Cortisolspiegel induziert, der auch für depressive Patienten dokumentiert ist (Liu et al., 2006). Zudem ist eine geringere Aktivität des SCN *per se* für depressive Patienten belegt, die von einer verminderten Expression der AVP-mRNA begleitet wird (Zhou et al., 2001). Interessanterweise belegen tierexperimentelle Studien, dass AVP-Neurone des SCN einen modulierenden Effekt auf CRH-Neurone im PVN ausüben (Kalsbeek et al., 1992). Sowohl eine Involvierung des CRH-PVN Stressachsen-Systems, als auch des AVP-SCN circadianen Systems sind demnach für depressive Erkrankungen naheliegend. Da auch dem von Pinealozyten ausgeschütteten Melatonin eine zentrale Bedeutung bei der Regulation circadianer und saisonaler Rhythmen zukommt, wird ebenfalls eine Beteiligung von Melatonin bei der Entstehung saisonal abhängiger Depressionen postuliert (Pandi-Perumal et al., 2006).

1.4 Melatonin

Melatonin ist ein Serotoninderivat mit schlaffördernder Wirkung. Bei Säugetieren wird Melatonin bei Fehlen eines Lichtsignals von Zellen des Pinealorgans im Zwischenhirn in den Blutkreislauf abgegeben. Sobald Licht auf die Netzhaut trifft, wird die Ausschüttung unterbunden. Auf diese Weise werden neben Tag- und Nachtrhythmus wichtige Körperfunktionen wie Blutdruck, Körpertemperatur, Appetit und Hormonausschüttung reguliert. In Einklang mit diesen Befunden werden bei alten, unter Schlaflosigkeit leidenden, Menschen erniedrigte nächtliche Melatoninspiegel beobachtet. Zudem wird bei vielen Menschen während der lichtarmen Monate auch tagsüber eine erhöhte Menge von Melatonin im Blut gemessen. Diese Personen leiden als Folge an Müdigkeit, Antriebsschwäche und einer verschobenen circadianen Rhythmik. Obwohl signifikante Alterationen der Melatoninsekretion ein häufiges Merkmal depressiver Patienten sind (Srinivasan et al., 2006; Wirz-Justice, 2006), konnte eine pathophysiologische Rolle des Melatonins bei der Entstehung von Depressionen bis heute nicht wissenschaftlich dokumentiert werden. Eine mögliche Ursache mag dadurch begründet sein, dass Depressionsforschung häufig am Mausmodell durchgeführt wird, viele Mauslinien aber durch eine Spontanmutation im N-acetyltransferase (NAT) Enzym, kein Melatonin synthetisieren können. Eine Studie von Goto et al. (1989) ergab, dass von 36 Zuchtlinien nur fünf Mäusestämme in der Lage sind, epiphysäres Melatonin in messbaren Mengen zu bilden. Zu diesen Stämmen zählen die Inzuchtlinien C3H/He und CBA/Ms sowie die drei „wild-derived“ Stämme Mol-A,

Mol-Nis und MOM. Die allerdings häufig für tierexperimentelle Verhaltensstudien und genetische Untersuchungen frequentierten C57BL/6 Mäuse gehören nicht zu diesen fünf melatoninprofizienten Mäusestämmen. Die Rolle des Melatonins bei depressiven Erkrankungen wird daher bereits in den meisten Versuchsansätzen durch die Wahl des Mausstammes im Vorfeld ausgeschlossen. Interessanterweise hat sich jedoch Agomelatin, ein Naphtalenanalogon des Melatonins, in verschiedenen klinischen Untersuchungen durch seine antidepressiven Eigenschaften bei äußerst wenigen Nebenwirkungen ausgezeichnet. Diese Substanz wird im Rahmen der aktuellen Forschung als mögliches, neues Antidepressivum postuliert (Fuchs *et al.*, 2006; Pandi-Perumal *et al.*, 2006 und Goodwin, 2008). Agomelatin wirkt agonistisch an den Melatoninrezeptoren MT1 und MT2 sowie antagonistisch am 5-HT_{2C} Serotoninrezeptor. Es ist in der Lage, die Wirkung von Neurotransmittern im frontalen Kortex zu verstärken und wirkt sich fördernd auf die Neurogenese im Hippocampus aus (Banaszek und Duman, 2007). Zudem wird Agomelatin bei der Behandlung von Jet-lag Beschwerden genutzt (de Bondiat *et al.*, 2010). Charakteristisch für eine Jet-lag Symptomatik sind nächtliche Schlaflosigkeit, verminderte Aufmerksamkeit, niedergeschlagene Stimmung, Appetitlosigkeit und herabgesetzte, kognitive Fähigkeiten (Srinivasan *et al.*, 2008). Diese Symptome sind interessanterweise auch für depressive Patienten dokumentiert. Zudem wirkt sich Agomelatin positiv auf die Schlaflänge und Schlafqualität aus bei einer gleichzeitig verkürzten Schlaflatenz. Es besitzt Zeitgebereigenschaften und ist in der Lage die innere Uhr zu synchronisieren. Seit April 2009 wird Agomelatin unter den Handelsnamen Valdoxan[®] und Thymanax[®] vertrieben. Ferner wurden im September 2009 - anlässlich des 22. Europäischen Kongresses "European College of Neuropsychopharmacology" (ECNP) in Istanbul - neue Belege für die antidepressive Wirksamkeit von Agomelatin bekannt gegeben (Hale *et al.*, 2009).

Aufgrund dieser Befunde ist die Beteiligung eines gestörten Melatoninstoffwechsels an depressiven Erkrankungen wahrscheinlich. Weiterführende Forschungsarbeiten in diesem Bereich sind daher als interessant, innovativ und vielversprechend zu erachten.

1.5 Argumente für die Etablierung eines neuen Mausmodells

Einen Zusammenhang zwischen verkürzter Tageslänge und dem Auftreten depressiver Erkrankungen legen die Befunde zur SAD nahe. Ein Tiermodell, mit dem die zugrunde liegende Pathophysiologie untersucht werden kann, ist allerdings nicht etabliert. Die klinischen Studien zur SAD dokumentieren, eine gestörte circadiane Rhythmik der Betroffenen, einen positiven Effekt von Lichttherapie und eine höhere Prävalenz der Erkrankung, die mit zunehmender Entfernung vom Äquator steigt. Eine Beteiligung von Melatonin an der Ätiologie der SAD wird vermutet.

Ein möglicher Kontext von Depression und Melatonin wird in tierexperimentellen Studien bereits untersucht (Dubocovich *et al.*, 1990; Imbesi *et al.*, 2006) jedoch nicht in Verbindung mit einer Veränderung der inneren Uhr. Circadiane Rhythmik wird dafür in tierexperimentellen Studien analysiert, die sich mit dem Einfluss verschiedener Licht-Dunkel Phasen auf endogene Mechanismen beschäftigen, nicht aber im Zusammenhang depressiver Erkrankungen. Dieses Phänomen ist erstaunlich, da eine gestörte circadiane Rhythmik bei vielen depressiven Patienten belegt ist und auch der positive Effekt der Lichttherapie mit einer Resynchronisation der inneren Uhr in Verbindung gebracht wird. Nach diesen Daten scheint für tagaktive Lebewesen ein geregelter Tagesrhythmus und eine genügend große Anzahl von Sonnenstunden pro Tag zu ihrem Wohlbefinden beizutragen. Eine Verlängerung der Dunkelphase hingegen begünstigt das Auftreten von Depressionssymptomen. Mäuse sind allerdings nachtaktive Lebewesen. Bei der Etablierung eines neuen Tiermodells für SAD Erkrankungen ist dies entsprechend zu berücksichtigen. Auf dieser Basis wurde im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit die Hypothese aufgestellt, dass durch eine Verlängerung der Lichtperiode das Auftreten von depressionsähnlichen Symptomen bei Mäusen begünstigt wird. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, ein neues Mausmodell zur Charakterisierung der saisonal abgängigen Depression beim Menschen zu etablieren. Primär sollten die folgenden zwei Fragen unter verhaltens-neurobiologischen und molekularen Aspekten geklärt werden:

1. Führt eine verlängerte Lichtperiode im Tageszyklus von Mäusen zu einer depressionsähnlichen Symptomatik?
2. Können die Verhaltensauffälligkeiten und molekularen Veränderungen durch antidepressiv wirksame Substanzen beeinflusst werden?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Arbeitsgeräte

Affymetrix Station	Hybridisierungssofen 645, Fluidics Station 450 und Scanner 3000 7G, Affymetrix, High Wycombe, UK
Analysenwaage	BP 121 S, Sartorius AG, Göttingen, D
Bewegungsdetektoren	Infra-e-motion, Henstedt– Ulzburg, D
CCD Kamera	KY-F75U, JVC ,Friedberg, D
Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Entwicklermaschine	X-OMAT 1000, Kodak GmbH, Stuttgart, D
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan 2, Carl Zeiss AG, Jena, D
Heizmagnetrührer	MR 3001 K, Heidolph, Fisher, Düsseldorf, D
Gefrierschrank -80 °C	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, D
Geldokumentation	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Homogenisator	Precellys 24, peqlab GmbH, Erlangen D
Kombischüttler	KL2, Edmund Bühler GmbH, Hechingen, D
Konfokalmikroskop	FV1000, Olympus GmbH, Hamburg, D
Kryostat	CM3050S, Leica GmbH, Wetzlar, D
Lichtmikroskop	Axioplan 2, Carl Zeiss AG, Jena, D
Mikroplatten-Lesegerät	MRX Dynex Technologies, Denkendorf, D
Offenfeld	TSE Systems GmbH, Bad Homburg, D
pH-Meter	inoLab, WTW GmbH, Weilheim, D
Pipetten	Research, Eppendorf, Hamburg, D
real-time PCR System	Taqman 7900HT, Applied Biosystems, Darmstadt, D
Rotationsmischer	Vortex Genie 2, Bender & Hobein, Zürich, CH
Thermocycler	UNO II, Biometra, Göttingen, D
Thermomixer	Thermomixer Compact, Eppendorf, Hamburg, D
UV Spektrometer	ND-1000, Thermo Scientific GmbH, Schwerte, D
Zentrifugen	5415R, Eppendorf, Hamburg, D Multifuge 3SR, Heraeus Instruments GmbH, Hanau D

2.1.2 Chemikalien

Acetonitril	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Borsäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
BrdU	Fluca Analytical, Taufkirchen, D,
BSA Fraction V	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
DAB	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
dNTPs Mix (10 mM)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
DTT (0,1 M und 2 M)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Ethylenglycol	Fluca Analytical, Taufkirchen, D,
Fluoxetin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Formamid	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Glycerin	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Imipramin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Ketamin (Ketavet)	Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen, D
Kochsalzlösung (0,9%)	Deltaselect GmbH, Dreieich, D
Melatonin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
N-Isobutyryl-L-cystein	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Natriumazid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Natriumchlorid (NaCl) 0,15 M	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Natriumcitrat	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Nickelsulfat (NH ₄ /Ni-SO ₄)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ Primer (0,5 µg/µl)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
PBS Tabletten	Gibco/ Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
RNase Zap	Ambion/ Applied Biosystems, Darmstadt, D
Roti Histokit II	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Salzsäure (37%)	Roth GmbH, Karlsruhe, D
TCA	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Tris	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Taqman Universal Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, D
TritonX-100	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Ultrapure Wasser (H ₂ O)	Gibco / Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
H ₂ O ₂ (30%)	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Xylazin (2%)	aniMedica, Senden-Bösensell, D
Ziegenserum	Dianova, Hamburg, D

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Autoradiographiefilme	GE Healthcare Europe GmbH ,München, D
Einbettmedium	Tissue Tek, Compound Sakura Finetek, USA
Eindeckmedium für	
• ABC	RotiHistoKit II; Roth GmbH, Karlsruhe, D
• Fluoreszenz	Vectashield H 1200 mit DAPI; Vector, CA, USA
GeneChip®	Mouse Genome 430 2.0 Array Affymetrix, High Wycombe, UK
Kanülen	14G Vasofix® und 27G Sterican®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Keramikkügelchen	MagNA Lyser Green Beads®, Roche Dianostics GmbH, Mannheim, D
Membransiebchen	selbst hergestellt mit Membran aus Cell Strainer 100 µm, BD Falcon, Bedford, USA
Nylon Transfermembran	Schleicher & Schuell, Dassel, D
Objektträger	SuperFrost® Plus Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, D
Reaktionsgefäße	Safelock 0,5 und 2 ml, Eppendorf, Hamburg, D 0,2 ml Sarstedt, Nümbrecht, D
Taqman PCR Platten	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Whatmanpapier	Schleicher & Schuell, Dassel, D
Zellkulturschalen	6 und 24 well Becton & Dickinson, Aalst, B
Zentrifugenröhrchen	15 und 50 ml Becton & Dickinson, Aalst, B

2.1.4 Kits für die Molekularbiologie

RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Böblingen, D
BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Scientific GmbH, Schwerte, D
BDNF E _{max} ImmunoAssay Kit	Promega GmbH, Mannheim, D
Corticosteron EIA Kit	IDS GmbH, Frankfurt am Main, D
GeneChip® Hybridization Wash und Stain Kit	Affymetrix, High Wycombe, UK
GeneChip® Two-Cycle Target Labeling Kit	Affymetrix, High Wycombe, UK
RNeasy® Micro Kit	Qiagen, Hilden, D
VECTASTAIN® ABC Kit	Vector, CA, USA

2.1.5 Taqman Assays

<u>Gen</u>	<u>Assay-Nummer</u>
b-Actin	Mm00607939_s1
Copg2as2	Mm01165812_m1
CRF	Mm01293920_s1
CRF BP	Mm01283832_m1
CRF R1	Mm00432670_m1
CRF R2	Mm00438303_m1
Drd1a	Mm01353211_m1
Egr2	Mm00456650_m1
GAPDH	Mm99999915_g1
Homer1	326207 Lot 326207
Kalrn	Mm00616605_m1
NR4a2	Mm00443056_m1

2.1.6 Antikörper

Primärantikörper

Ratte anti BrdU IgG, monoklonal, Verdünnung 1:500	Abcam, Cambridge, UK
Maus anti Neuronal Nuclei (NeuN) Alexa Fluor 488 conjugated monoklonal, Verdünnung 1:250	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D

Sekundärantikörper

Biotin-SP-Conjugated Affini Pure Ziege anti Ratte IgG (H+L) Verdünnung 1:500	Dianova, Hamburg, D
Alexa Fluor 594 Ziege anti Ratte IgG Verdünnung 1:500	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D

2.1.7 Enzyme

Ribonuclease H (2 U/μl)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
RNase OUT™ (40 U/μl)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
SuperSkript™ II (200 U/μl) Reverse Transkriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D

2.1.8 Puffer und Lösungen

BrdU-Injektionslösung	5 mg in 1 ml isotonischer Kochsalzlösung
BDNF-Lysispuffer	137 mM NaCl 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 1% Nonidet-P40 10% Glycerol 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
Borsäure (0,3 N)	0,1 M Borsäure (M: 61,83) 3,09 g ad 500 ml Ultrapure Wasser; pH 8,5
DAB-Lösung	20 mg DAB in 1 ml Ultrapure Wasser
Färbereagenz	80 μl DAB-Lösung 400 μl Nickelsulfat-Lösung auf 10 ml TBS (1x)
Gefrierschutzlösung	25% Glycerin 25% Ethylenglycol 50% PBS (1x) Zusatz von 0,025% Natriumazid
HCl (2 N)	167 ml 37%ige HCl in 1000 ml Ultrapure Wasser
Ketamin-Xylazin-Lösung	100 mg/kg Ketamin 10 mg/kg Xylazin 2% in steriler 0,9%iger Kochsalzlösung
Nickelsulfat-Lösung	50 mg/ml NH ₄ /Ni-SO ₄
PFA Lösung (4%)	20 g PFA in 450 ml Ultrapure Wasser auf 70°C erhitzen, ~ 400 μl NaOH (2 N) zugeben (Lösung wird klar) 50 ml PBS (10x) zugeben; pH 7,2
PBS (10x)	1 Tablette von Gibco 5 g (0,14 M NaCl, 0,01 M PO ₄ , 0,003 M KCl) in 50 ml Ultrapure Wasser; pH 7,4

PBS (1x)	1 Tablette von Gibco 5 g (0,14 M NaCl, 0,01 M PO ₄ , 0,003 M KCl) in 500 ml Ultrapure Wasser; pH 7,4
SSC (2x)	300 mM NaCl 30 mM Natriumcitrat
SSC-Formamidlösung	50% Formamid (1x) 50% SSC (2 x)
TBS-plus	3 Vol% TritonX-100 (10%), 5 Vol% Ziegenserum, 2 Vol% BSA in TBS (1x)
TBS (10x)	1 M Tris-HCl (157,6 g/l) 1,5 M NaCl (87,6 g/l); pH 7,5
TBS (1x)	100 ml TBS (10x) in 1000 ml Ultrapure Wasser
TritonX-100 (10%)	10 ml TritonX-100 in 100 ml Ultrapure Wasser
Wasserstoffperoxidlösung (0,6%)	1 ml H ₂ O ₂ (30%) in 50 ml TBS (1x)

2.1.9 Computersoftware und Datenbanken

Actimot	TSE Systems GmbH, Bad Homburg, D
Expression Console 1.1	Affymetrix, High Wycombe, UK
GeneSpring GX 10.01	Agilent Technologies GmbH, Waldbronn, D
Mouse-e-motion	Infra-e-motion, Henstedt-Ulzburg, D
NIS Elements Version AR 3.0	Nikon GmbH, Düsseldorf, D
Office 2008 (Excel, Word)	Microsoft Corporation, USA
Prism 4.0	GraphPad Software Inc., USA
Revelation 4.22	Dynex Technologies, Denkendorf, D
SDS 2.2	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Statistica	StatSoft Inc., USA
Videomot	TSE Systems GmbH, Bad Homburg, D
BLAST at NCBI	www.ncbi.nlm.nih.gov/blast
Entrez at NCBI	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez
Mouse Genome Server	www.ensembl.org/Mus_musculus

2.2 Versuchstiere

Für die Versuche wurden 298 männliche Mäuse, gleichen Alters, vom Inzuchtstamm C3H/HeN der Firma Janvier (www.janvier-breedingcenter.com) verwendet. Zusätzlich wurden für einen ersten Vorversuch 10 männliche C57BL/6J Mäuse (The Jackson Laboratories, USA) getestet. Die Mäuse wurden einzeln in Makrolonkäfigen des Typs I gehalten. Lediglich im Illuminationsversuch 3 wurden die C3H/HeN Mäuse in Sechsergruppen in Makrolonkäfigen des Typs II gehalten. Wasser und Futter stand den Mäusen *ad libitum* zur Verfügung. Wasser wurde über die gesamte Haltungszeit mittels zwei nebeneinander angeordneten Trinkflaschen angeboten. Dadurch wurde eine Seitenpräferenz bei der Flüssigkeitsaufnahme vermieden. Die Raumtemperatur lag bei $20 \pm 2^\circ\text{C}$, die Luftfeuchtigkeit bei $45 \pm 5\%$. Der Tag-Nacht Rhythmus betrug, sofern nicht anders erwähnt, unter diesen Standardlaborbedingungen 12:12 Stunden (Lichtphase von 7:00 – 19:00 Uhr). Die Beleuchtungsstärke am Käfigboden lag bei 200 lux und wurde mittels LifeLite® Tageslichtlampen der Firma best-lite (Neu-Eichenberg, D) erreicht. Nach einer zweiwöchigen Eingewöhnungszeit wurden die Tiere in zwei separaten Bereichen des Haltungsraumes untergebracht, die völlig unabhängig voneinander beleuchtet werden konnten. Das Alter der Tiere betrug zu Beginn des Vorversuchs 22 Wochen. Für die übrigen Versuche lag das Alter der Mäuse zu Versuchsbeginn bei acht Wochen. Die Tierhaltung erfolgte nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes.

2.3 Medikamentöse Behandlung

Imipramin (20 mg/kg/Tag), Fluoxetin (10 mg/kg/Tag) und Melatonin (1,5 mg/kg/Tag) wurde den Mäusen oral über das Trinkwasser verabreicht. Das Körpergewicht der Tiere wurde zweimal wöchentlich, der individuelle Trinkkonsum jedes Tieres täglich bestimmt. Körpergewicht und Trinkverhalten dienten zur Berechnung der täglichen, individuellen Medikamentendosis für jede Maus.

BrdU wurde mit 50 mg/kg an drei aufeinander folgenden Tagen in einem Intervall von acht Stunden in 0,9%iger Kochsalzlösung intraperitoneal appliziert. Die Lagerung von BrdU erfolgte bei -20°C .

2.4 Methoden zur Verhaltensanalyse

2.4.1 Heimkäfigaktivität

Die Aktivität der Tiere in ihrem Heimkäfig wurde mit Hilfe von mobilen MOUSE-E-MOTION-Universal-Datenloggern der Firma Infra-e-motion aufgezeichnet. Jeder Käfig erhielt dafür einen eigenen Datenlogger. Die Bewegungsdetektion erfolgte über die von den Tieren abgegebene Wärmestrahlung mittels eines passiven Infrarotsensors. Die Auflösungsgrenze des Sensors betrug 1,5 cm. Das Wandmaterial der verwendeten Käfige war für die infrarote Strahlung undurchlässig. Ein Einfluss aus der Versuchsumgebung war daher auszuschließen. Die Bewegung der Maus wurde jede Sekunde vom Sensor detektiert und als summierter Wert alle 15 Minuten im Datenlogger gespeichert. Die Messung der Aktivität fand an zwei aufeinander folgenden Tagen für 48 Stunden statt. Aus den Daten wurde wöchentlich ein 24 Stunden Aktivitätsprofil für jede Maus ermittelt.

2.4.2 Saccharin-Präferenz-Test

Um die Vorliebe der Mäuse für eine süße Lösung zu testen wurde im Vorversuch der Saccharin-Präferenz-Test gewählt. Bei diesem Versuch hatten die Versuchstiere zunächst täglich für 24 Stunden die Wahl zwischen Wasser und einer 1%igen Saccharinlösung. Die Anordnung der Trinkflaschen für Saccharin und Wasser wurde täglich getauscht, um eine Bevorzugung der Tiere für eine Trinkseite auszuschließen. Da im Laufe der Versuchszeit die Präferenz für die süße Lösung bei Tieren unter den Standardlaborbedingungen abnahm, wurde die Versuchsdurchführung während dieses Experimentes geändert. Ab der fünften Woche wurde der Saccharin-Präferenz-Test im Vorversuch lediglich an zwei aufeinander folgenden Tagen pro Woche für 24 Stunden durchgeführt.

2.4.3 Sucrose-Präferenz-Test

Da C3H/HeN Mäuse die 1%ige Saccharinlösung gegenüber dem Wasser nicht bevorzugten, wurde in den anschließenden Versuchsreihen der Sucrose-Präferenz-Test gewählt. Dieser wurde wöchentlich an zwei aufeinander folgenden Tagen für drei Stunden durchgeführt. Jeweils eine Trinkflasche mit Leitungswasser wurde durch eine Trinkflasche, mit 8%iger Sucroslösung ersetzt. Die Flaschen wurden vor dem Einbringen in den Käfig und unmittelbar nach dem Entfernen gewogen. Am folgenden Tag fand ein Positionstausch der Flaschen statt, um eine mögliche Seitenpräferenz auszuschließen. Die Sucrose-Präferenz wurde für jede Maus als prozentualer Anteil der konsumierten Sucrose-Lösung zum Gesamtanteil der getrunkenen Flüssigkeit beider Tage berechnet. Für eine erfolgreiche Versuchsdurchführung war zu beachten, dass die Tiere der einzelnen Versuchsgruppen zu Beginn der Versuchsreihe ein ähnliches Konsumverhalten zeigten.

2.4.4 Offenfeld-Test

Die Konfrontation mit einer fremden Umgebung bedeutet für jedes Lebewesen Stress. Das Erkundungsverhalten eines Tieres in einer neuen Umgebung gibt daher Aufschluss, wie gut sich das Tier an diese neue Situation anpassen kann. Neugier, die unbekannte Situation zu erkunden und die Angst vor der neuen Situation (Neophobie) beeinflussen dabei gleichzeitig sein Verhalten. Bei Menschen mit affektiven Erkrankungen sind häufig, sowohl Neugierde, als auch Angst verändert. In Übereinstimmung mit der humanpathogenen Situation zeigen Nager im Depressionsmodell der Bulbektomie ein hyperaktives Verhalten in fremder Umgebung, das auf eine fehlerhafte Anpassung an die neue Situation hindeutet (Cryan und Mombereau, 2004; Zueger *et al.*, 2005). Das Erkundungsverhalten der Mäuse wurde in der vorliegenden Arbeit im Offenfeld bestimmt. Bei dem Offenfeld handelte es sich um eine, am Boden mit 100 lux beleuchtete, Arena (45x45x22 cm). Zu Beginn des Testes wurde jede Maus in die Mitte dieser Arena gesetzt. Sowohl die horizontale als auch vertikale Aktivität wurde während der Testzeit für jedes Tier mittels Infrarotsensoren detektiert. Ein automatisches Meßsystem (Actimot, TSE Systems GmbH) registrierte jede Unterbrechung der Infrarot-Lichtschraken und speicherte die Daten für eine spätere Auswertung. Nach erfolgtem Test wurde jede Maus zurück in ihren Heimkäfig gesetzt und die Arena gründlich mit 70%igem Ethanol gereinigt.

2.4.5 „*novelty suppressed feeding*“-Test

Der Einfluss einer möglichen Angstkomponente auf das Verhalten der Tiere im Offenfeld wurde mit Hilfe des „*novelty suppressed feeding*“ (NSF)-Test bestimmt. Die Testarena (45x45x22 cm) war für die Tiere unbekannt, mit 250 lux am Boden beleuchtet und mit zwei cm frischer Käfigeinstreu bedeckt. In der Mitte der Box befand sich eine kreisförmige Plattform aus Whatmanpapier (12 cm Durchmesser). Auf diesem Papier lag ein, für die Tiere vertrautes, Futterpellet. Allen Tieren wurde 24 Stunden vor dem Versuch das Futter entzogen, damit die Tiere einen gewissen Anreiz hatten sich dem Futterpellet zu nähern. Jede Maus wurde zu Beginn des Tests in eine Ecke der Testarena gesetzt. Die Latenzzeit, die jedes Tier benötigte das Futterpellet mit seiner Schnauze zu berühren wurde festgehalten. Die maximale Testzeit betrug fünf Minuten. Im direkten Anschluss an den Test wurde jede Maus für weitere fünf Minuten zurück in ihren Heimkäfig gesetzt und ihr Futterkonsum während dieser Zeit ermittelt. Auf diese Weise konnte bestimmt werden, wie hungrig und damit motiviert die Mäuse zu Versuchsbeginn waren.

2.4.6 „*novel-cage*“-Test

Das Erkundungsverhalten von Mäusen in einer unbekannten Umgebung ist neben den gegensätzlichen Motivationsfaktoren Angst und Neugier auch von der Größe der Testarena abhängig. Da Nagetiere agoraphobisch sind, meiden sie weite Plätze (Belzung, 1999). Zusätzlich zum Offenfeld-Test wurde das Erkundungsverhalten der Mäuse daher in einem neuen Heimkäfig („*novel cage*“) analysiert. Die Größe der Testumgebung war den Mäusen vertraut, ebenso verhielt es sich mit der Testsituation, weil die Tiere jede Woche in einen frischen Käfig gesetzt wurden. Der neue Heimkäfig war mit frischer Einstreu versehen und bis auf das Fehlen von Futter und Wasser identisch zu dem vertrauten Heimkäfig. Zusätzliche Faktoren, die eine Angstreaktion bei den Tieren provozieren konnten, wurden durch das gewählte Versuchsdesign ausgeschlossen. Das auf diese Weise ermittelte Erkundungsverhalten der Tiere reflektiert somit gut ihre Neugier und Motivation. Der Versuch begann sobald die Maus mit dem neuen Heimkäfig in Kontakt trat. Wie auch im Offenfeld-Test hielt das automatische Meßsystem (Actimot, TSE Systems GmbH) die zurückgelegte Distanz der Tiere fest. Die Testdauer betrug fünf Minuten, die Beleuchtungsintensität am Käfigboden etwa 100 lux.

2.4.7 „*forced-swimming*“-Test

Depressionsähnliches Verhalten in Form von „*behavioral despair*“ kann mit Hilfe des „*forced-swimming*“-Test (FST) beurteilt werden. In diesem von Porsolt und Kollegen 1977 entwickelten und gut etablierten Paradigma wird das Verhalten einer Maus in einem bis zur Hälfte mit Wasser gefüllten Zylinder untersucht (Porsolt *et al.*, 1977). Die Konfrontation mit dieser ausweglosen, aversiven Situation löst zunächst flucht-orientiertes Verhalten bei den Tieren aus. Später nehmen die Tiere eine immobile Körperhaltung im Wasser ein und lassen sich treiben. Die Zeit, die Mäuse in einer immobilen Haltung verbringen, wird als depressionsähnlicher Zustand interpretiert, da zuvor verabreichte Antidepressiva die bewegungslose Zeitdauer zugunsten aktiver Fluchtversuche verringern. Wie es der Test vorsieht, wurden die Tiere einzeln für sechs Minuten in ein zur Hälfte mit Wasser gefülltes Becherglas gesetzt (Höhe des Becherglases: 26,5 cm, Durchmesser: 16,5 cm, Wasserhöhe: 15 cm, Wassertemperatur: 25°C). Nach einer initialen Phase von zwei Minuten wurde die Zeit, in der sich die Maus ohne Schwimmbewegungen der Beine auf der Wasseroberfläche treiben ließ additiv mittels einer Stoppuhr festgehalten.

2.4.8 „*tail-suspension*“-Test

Ähnlich wie der FST beurteilt der „*tail-suspension*“-Test (TST) das Verhalten einer Maus in einer ausweglosen Situation. Bei diesem von Steru und Kollegen 1985 entwickelten Test wird jede Maus einmalig für eine Zeitdauer von sechs Minuten an ihrem Schwanz fixiert (Steru *et al.*, 1985). Die Immobilität der Tiere während der letzten vier Testminuten wird aufgezeichnet. Ähnlich wie im FST wird eine immobile Körperhaltung als depressionsassoziiertes Verhalten interpretiert, das gleichzeitig die Aufgabe der Hoffnung auf eine erfolgreiche Flucht darstellt (Steru *et al.*, 1985). Das reaktive Verhalten der Tiere lässt sich im TST sowohl mittels Antidepressiva als auch durch genetische Manipulation beeinflussen. Im Unterschied zum FST nehmen Tiere im TST jedoch sehr viel schneller eine immobile Haltung ein. Auf der anderen Seite wechseln die Tiere im TST häufiger immobile und mobile Phasen. Jede Maus wurde für diesen Test mit einem Klebestreifen an einer Tischkante fixiert und ihr Verhalten für die kommenden sechs Minuten untersucht.

2.4.9 Test auf soziale Affinität

Das Interesse einer Maus an einem unbekannten Partner, wurde mit Hilfe eines sozialen Interaktionstests untersucht. Defizite in sozialem Interaktionsverhalten werden von Mäusen häufig im Kontext von autistischen Erkrankungen untersucht, sind aber auch in Depressionsmodellen zu finden. Bulbektomierte Mäuse zeigen beispielsweise ein reduziertes und aggressionsloses Sozialverhalten, das von einer geringen territorialen Verteidigung begleitet wird (Mucignat-Caretta *et al.*, 2004). Für diesen Test wurden die Versuchstiere in eine Arena (45x45x22 cm) gesetzt, deren Beleuchtung am Boden etwa 100 lux betrug. An einer Längsseite der Arena stand mittig ein leerer, säulenförmiger Gitterkäfig von 10 cm Durchmesser. Nach fünf Minuten wurde der leere Gitterkäfig mit einer Partnermaus bestückt. Während dieser Zeit (etwa zwei Minuten) wurde das Versuchstier in seinen vertrauten Heimkäfig zurückgesetzt. Direkt im Anschluss hatte diese zu testende Maus erneut fünf Minuten Zeit die Arena zu erkunden. Der Versuchsmouse war es jetzt möglich olfaktorisch und visuell mit der Partnermaus in Kontakt treten. Das Verhalten aller Mäuse wurde mit einer Videokamera aufgezeichnet und anschließend mit der Videomot Software (TSE Systems) ausgewertet. Für die Auswertung wurde die quadratische Testarena optisch in 16 Quadrate unterteilt. Durch diese Vorgehensweise konnte kumulativ die Zeit ermittelt werden, die jede Maus in einem dieser Quadrate verbrachte. Es wurde die Zeit verglichen, die eine Maus um den Gitterkäfig verbrachte, sofern dieser leer war oder eine Partnermaus enthielt. Eine gesteigerte Interaktionszeit gilt in diesem Kontext als Indikator für soziale Kontaktbereitschaft (Sams-Dodd, 1999). Bei den Partnermäusen handelte es sich um männliche *Penk1^{-/-}* Mäuse mit einem genetischen DBA Hintergrund. Diese Mäuse zeigen eine sehr geringe Interaktionsbereitschaft und minimieren so die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten aggressiver Verhaltensmuster (Bilkei-Gorzo *et al.*, 2005).

2.4.10 Bestimmung von Körpergewicht und Futterkonsum

Veränderungen von Fressverhalten und Körpergewicht werden im Kontext von Stress beobachtet. Dieses Phänomen bedingte eine Analyse der beiden Parameter in der vorliegenden Arbeit. Der Futterkonsum wurde durch Wiegen der Futterpellets zweimal pro Woche bestimmt. Die Gewichtsbestimmung der Tiere erfolgte stets an den gleichen Tagen. Wichtig bei diesem Versuch war, dass die Mäuse der einzelnen Gruppen zu Beginn der Versuchsreihe ein vergleichbares Körpergewicht aufwiesen.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Blutaufbereitung und Blutanalyse

Nach erfolgter Dekapitation der Versuchstiere fand die Entnahme der Blutproben aus den Halsgefäßen statt. Zur Serumgewinnung wurde das Blut in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen aufgefangen. Da keinerlei gerinnungshemmende Substanzen in den Reaktionsgefäßen vorlagen, begannen sich die roten Blutkörperchen innerhalb weniger Minuten zu vernetzen. Damit die Blutkuchen vollständig kontrahierten, wurden alle Blutproben eine Stunde bei Raumtemperatur aufbewahrt und anschließend über Nacht bei 4°C gelagert. Am Folgetag erfolgte eine Zentrifugation der Proben bei 4°C und 2000 rpm für 20 Minuten. Höhere Zentrifugalbeschleunigungen waren zu vermeiden, um eine Zerstörung der roten Blutkörperchen zu verhindern. Nach der Zentrifugation wurde das Serum abgenommen und der Blutkuchen verworfen. Bis zur weiteren Verwendung lagerten alle Serumproben bei -80°C. Vorhandenes Corticosteron im Serum dieser Proben wurde nach Herstellerangaben mit dem Corticosteron EIA Kit der Firma IDS ermittelt. Die Sensitivität des Immuntestes lag oberhalb von 0,17 ng/ml.

2.5.2 Organentnahme

Im Anschluss an die Blutabnahme wurden den Versuchstieren die Nieren samt Nebennieren sowie die Gehirne entnommen und bei -80°C eingelagert.

2.5.3 Präparation der Gehirnnareale

Die Schädelplatten dekapitierter Tiere wurden geöffnet, die Gehirne von der Schädelbasis gelöst und in trockeneisgekühltem Isopentan schockgefroren. Relevante Gehirnnareale wurden aus koronalen Kryostatschnitten (200 µm) der unfixierten Gewebe präpariert. Dazu wurden Gehirnbereiche von Interesse mit Hilfe einer abgestumpften 14G Vasofix® Kanüle (Innendurchmesser 1,75 mm) ausgestochen. Zur anatomischen Orientierung im Mausgehirn wurde der Paxinos und Franklin Atlas herangezogen (Paxinos und Franklin, 2001). Diese Vorgehensweise erlaubte eine gute Vergleichbarkeit aller Gehirnnareale. Die RNA- und Protein-Isolierung erfolgte mit dem RNeasy® Micro Kit von QIAGEN nach Herstellerangaben und unter Verwendung von MagNA Lyser Green Beads®.

2.5.4 Quantitätsbestimmung von RNA und Proteinen

Konjugierte Doppelbindungen in den aromatischen Ringen von Nukleinsäurebasen absorbieren UV Licht bei etwa 260 nm. Diese Eigenschaft ermöglicht die Konzentrationsbestimmung von RNA mittels UV-Spektroskopie. Eine optische Dichte von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 40 ng/μl für RNA und 50 ng/μl für DNA. Die Reinheit der gemessenen Nukleinsäure wird über den Quotienten 260 zu 280 nm ermittelt. Reine RNA besitzt Werte von 2,0. Ergebnisse um 1,8 weisen auf eine Verunreinigung der Lösung mit DNA hin. Werte unterhalb von 1,8 deuten auf Kontaminationen durch Proteine, Phenol oder andere Substanzen mit einer Absorption nahe 280 nm hin. Die UV-Spektroskopie fand unter Verwendung des ND-1000 statt.

Die Bestimmung der Proteinmengen erfolgte mit Hilfe des BCA-Kits von Pierce. Alle Proben wurden in einer Microtiterplatte nach dem Protokoll des Herstellers vorbereitet und am MRX-Plattenlesegeräte mit der Software Revelation 4.22 (Dynex Technologies) ausgewertet. Da stets eine sehr geringe Menge an Gesamtprotein zu erwarten war, wurden die Proben als Duplikate in einem halbierten Volumenansatz bestimmt.

2.5.5 Qualitätsbestimmung der RNA

Die Qualität der RNA wurde kapillarelektrophoretisch mit dem Agilent Bioanalyzer 2100 bestimmt. Jeweils 1 μl RNA wurde in die Gelmatrix eines RNA 6000 Nano LabChip geladen, der eine Kapazität für maximal 12 Proben besitzt. Die Gelmatrix enthält einen fluoreszierenden Farbstoff, der in die RNA interkaliert und der Qualitätsbeurteilung dient. Neben den Proben wird auf dem Chip ein Längenstandart (*ladder*) aufgetragen. Als Referenz zwischen Längenstandart und RNA Probe wird zu jeder Probe und zu dem *ladder* ein interner Nukleinsäurestandart bekannter Größe (*marker*) gegeben. Diese Vorgehensweise ermöglicht die RNA Daten in Bezug zu dem Längenstandart zu setzen. Anhand der Konzentrationswerte der 28s und 18s ribosomalen RNAs (rRNA) wird die Qualität der gesamten RNA bewertet. Das Verhältnis der 28s rRNA zur 18s rRNA sollte dabei idealer Weise 2:1 betragen und wird als "*RNA integrity number*" (RIN) angegeben. RIN Werte von zehn reflektieren die Qualität von völlig intakter RNA, Werte um eins dagegen vollständig zersetzte RNA.

Die für molekularbiologische Untersuchungen eingesetzt RNA in dieser Arbeit wies RIN Werte oberhalb von neun und einen 260/280 nm Quotienten um zwei auf.

2.5.6 Microarray - Technologie

Microarrays dienen als Hochdurchsatzmessverfahren zur parallelen Expressionsbestimmung mehrerer Tausend Gene in einer Probe. Neben der Bestimmung der Expressionsstärke ist es gleichzeitig möglich differenziell regulierte Gene zu detektieren. (Marcotte *et al.*, 2001; Mirnics und Pevsner 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden DNA-Microarrays der Firma Affymetrix verwendet. Auf diesen „Mouse Genome 430 2.0“ Arrays sind laut Herstellerangaben mehr als 45.000 Oligonukleotidsonden aufgebracht, die mehr als 34.000 nachgewiesene Mausgene repräsentieren. Die Sonden sind 25 Basenpaare lang und durch *in situ* Synthese auf einem Glas-Objektträger innerhalb des Chips aufgebracht. An einer genau definierten Stelle der Glasoberfläche befinden sich viele identische Sonden, die einen Spot bilden. Die Oligonukleotidsonden jedes Spots weisen eine spezifische und zur Ziel-mRNA komplementäre Sequenz auf. Mit Hilfe einer Computersoftware ist es so im Anschluss an den Hybridisierungsprozess möglich, jedem Spot auf dem Chip ein Gen zuzuordnen. Ebenso kann über den Anteil an hybridisierter RNA, an einem Spot, Auskunft über die Menge der jeweiligen Genexpression geben werden.

Für das in dieser Arbeit beschriebene Chipexperiment wurden RNA Proben von jeweils drei Tieren aus den vier unterschiedlich behandelten Versuchstiergruppen isoliert. Jeweils 100 ng RNA des medialen präfrontalen Kortex wurden verwendet. Die 12 Proben wurden nach Herstellerangaben unter Verwendung des GeneChip® Two-Cycle Target Labeling Kits (Affymetrix) für die Hybridisierung auf den Chip vorbereitet. Das Wasch- und Färbeprotokoll wurde mit Hilfe der Fluidics Station 450 (Affymetrix) durchgeführt und die fertig behandelten Chips mit dem GeneChip®3000 7G Scanner (Affymetrix) eingelesen. Die Qualitätskontrolle sowie die Zuordnung jedes Spots des Microarrays zur Zielsequenz erfolgte mit der Software Expression Console 1.1 (Affymetrix). Zur weiteren Analyse wurden die Chipdaten mit der Software GeneSpring GX 10.01 ausgewertet. Die Rohdaten wurden mit Hilfe des RMA Algorithmus nach Expressionsstärke und signifikanter Veränderung gefiltert. Die differenzielle Expression wurde mittels einer ANOVA kalkuliert. Nur Kandidatengene, deren p-Werte unterhalb von 0,05 und Expressionswerte oberhalb einer 1,2-fachen Grenze lagen, wurden ausgewählt.

2.5.7 cDNA Synthese

RNA wurde mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) transkribiert. Da die enzymatische DNA-Synthese nur an doppelsträngigen Nukleinsäuren erfolgt, wurde jede RNA Probe mit Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primern versetzt. Diese lagern sich komplementär an die mRNA an und ermöglichen der Reversen Transkriptase (Superskript II) den Synthesestart. Da rRNA keinen Poly-A Schwanz an ihrem 3'-Ende besitzt wird bei diesem Verfahren gleichzeitig eine Vervielfältigung ribosomaler RNA ausgeschlossen. Der Reaktionsansatz und die Reaktionsbedingungen dieser Arbeit wurden wie folgt gewählt (Tab. 2.1):

Tab. 2.1: Reaktionsansatz und -bedingungen für die Reverse Transkription

Reagenzien	Volumen	Temperatur	Zeit
RNA (mindestens 250 ng)	10 µl		
Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ Primer	1 µl		
		70 °C	10 min
		4 °C	
5x First Strand Puffer	4 µl		
DTT, 0,1 M	2 µl		
dNTPs (je 10 mM)	1 µl		
RNase OUT	1 µl		
		42 °C	2 min
		4 °C	
Superscript II	1 µl		
		42 °C	60 min
		70 °C	15 min
		4 °C	10 min

2.5.8 Quantitative *real-time* PCR

Zum spezifischen Nachweis gesuchter Ziel-RNA wurde die quantitative real-time PCR (qRT-PCR) verwendet. Das Testprinzip beruht auf einer herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion bei der gleichzeitig die Menge nascierender cDNA über Fluoreszenz detektiert wird. Zusätzlich zu den genspezifischen Primern wird der cDNA Probe eine Sonde zugesetzt, die zwischen den PCR Primern nur auf der Zielsequenz bindet. Diese Sonden sind mit einem emittierenden Reporter-Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende sowie einem Quencher am 3'-Ende ausgestattet. Die Fluoreszenzemission des Reporters wird bei einer intakten Sonde durch die räumliche Nähe zum Quencher unterdrückt. In jeder Annealing-Phase der PCR lagern sich sowohl Primer, als auch Sonde komplementär an die cDNA. Während der Synthesephase trennt die *Taq*-Polymerase wegen ihrer 5'-, 3'-Exonucleaseaktivität den Reporter vom Quen-

cher. Die Fluoreszenz der Probe erhöht sich. Die Quantifizierung der eingesetzten cDNA-Menge erfolgt nach abgeschlossener PCR über die exponentielle Phase der PCR-Reaktion, da nur hier ideale Reaktionsbedingungen vorliegen. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Primer und Sonden in Form von Taqman-Assays verwendet. Jede cDNA Probe wurde in Triplikaten unter Verwendung des folgenden Mastermix-Ansatzes bestimmt (Tab. 2.2):

Tab.2.2: Reaktionsansatz für die quantitative PCR

Reagenzien	Volumen
Taqman® Universal PCR Master Mix (2x)	5,0 µl
20x Taqman® Gene Expression assay Mix	0,5 µl
H ₂ O	2,5 µl
cDNA	2,0 µl

Die Reaktionsansätze wurden auf Eis in eine 384er Microtiterplatte pipettiert. Anschließend wurde die Platte mit einer Folie (Optical Adhesive Covers) verschlossen und etwa 30 Sekunden zentrifugiert, um eventuelle Luftblasen zu entfernen. Die eigentliche qRT-PCR Messung erfolgte mit dem ABI Prism 7000 Sequence Detection System unter Verwendung des folgenden Temperaturprogramms (Tab.2.3):

Tab. 2.3: Reaktionsbedingungen für die quantitative PCR

Zeit (min)	Temperatur	Zyklusanzahl
2	50 °C	1
10	95 °C	1
1/6	95 °C	40
1	60 °C	
∞	4 °C	1

Über die Analyse-Funktion der Software SDS 2.2 wurde der Detektionsschwellenwert (C_T -Wert) bestimmt. Zur Bestimmung des ΔC_T -Wertes wurde der C_T -Wert des Zielgens vom C_T -Wert des konstitutiv expremierten Referenzgens (Gapdh bzw. beta-Aktin) derselben Probe subtrahiert. Dieser Vorgang wurde für sämtliche Proben durchgeführt. Anschließend wurde für jede Haltungsbedingung der Mittelwert der ΔC_T -Werte von Triplikaten berechnet. Die $\Delta \Delta C_T$ -Werte jeder Gruppe wurden bestimmt, indem die ΔC_T -Werte auf einen Kalibrator bezogen wurden. Als Kalibrator wurde stets der gemittelte ΔC_T -Wert der Gruppe unter Standardhaltungsbedingungen

(Kontrollgruppe) gewählt. Folgend wurde die relative mRNA Menge als Potenz zur Basis 2 mit den negativen $\Delta\Delta C_T$ -Werten als Exponenten angegeben.

Für die Auswertung dieses Verfahren wird vorausgesetzt, dass alle PCR-Reaktionen gleich effizient ablaufen und das gewählte Referenzgen nicht in seiner Transkripthäufigkeit differiert. Die gleichmäßige Expression des Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (Gapdh) Gens wird im Kortex jedoch durch Stress beeinflusst. Für alle Kortexproben wurde daher die Expression von beta-Aktin als Referenz gewählt. Dieses weist selbst nach Stress vergleichbare Transkripthäufigkeiten im Kortex auf. Allerdings variiert es in seiner Expressionsstärke in anderen Gehirnbereichen als Reaktion auf Stress (Vandesompele *et al.*, 2002).

2.5.9 BDNF Proteinbestimmung

Der BDNF Proteinanteil wurde mit Hilfe des E_{max} ImmunoAssay Systems bestimmt. Ein Ultraschallgerät zerkleinerte zunächst das in BDNF-Lysispuffer aufgenommene Hippocampusgewebe (3 x 30 s Zyklus 5). Das daraus resultierende Homogenat wurde bei 4°C und 13.000 rpm für 30 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden fünffach verdünnt und mit HCl nach Herstellerangaben behandelt. Die Analyse der Proben erfolgte in Duplikaten. Die Sensitivität des E_{max} ImmunoAssays lag oberhalb von 15 pg/ml.

Neben dem BDNF Anteil wurde von jeder Hippocampusprobe auch der Gehalt an Gesamtprotein mit dem BCATM Protein Assay ermittelt. Der Quotient BDNF-Protein [pg] zu Gesamtprotein [mg] gab den BDNF-Anteil jeder Probe an.

2.5.10 Gewichtsbestimmung der Nebennieren

Die gefrorenen Nieren samt Nebennieren wurden in einem Kryostat bei -18°C präpariert. Jede Nebenniere wurde von Niere und Fettgewebe abgetrennt und in ein Wägeschiffchen überführt. Das Gewicht aller Nebennieren wurde mit Hilfe einer Analysenwaage bestimmt und später zu dem Körpergewicht des jeweiligen Tieres ins Verhältnis gesetzt.

2.6 Immunhistochemie

Immunhistochemische Methoden wurden verwendet um retrospektiv den Anteil teilungsaktiver Zellen im murinen Hippocampus zu ermitteln. In 40 µm dicken, koronalen Gehirnschnitten wurde der Anteil an interkaliertem BrdU (2-Bromo-5-desoxyuridin) im Bereich des *Gyrus dentatus* bestimmt.

2.6.1 BrdU Injektion

BrdU ist ein Thymidin-Analogon das von Zellen in ihre DNA integriert werden kann. Aufgrund seiner kurzen Bioverfügbarkeit steht es nur Zellen zur Verfügung, die sich im Moment der Applikation in der S-Phase befinden. BrdU-markierte Zellen geben diese Markierung bei jeder weiteren Mitose an ihre Tochterzellen ab. BrdU ist daher noch ein Jahr nach der initialen Zellteilung mit Hilfe immunhistochemischer Verfahren nachweisbar (Kempermann *et al.*, 2003).

Für die vorliegende Arbeit wurde den Mäusen an drei aufeinander folgenden Tagen 50 mg/kg BrdU intraperitoneal injiziert. Die korrekte Platzierung der Kanülenspitze wurde durch Aspiration vor dem Spritzen geprüft. Die injizierten Tiere wurden 14 Tage nach Erstapplikation narkotisiert und perfundiert.

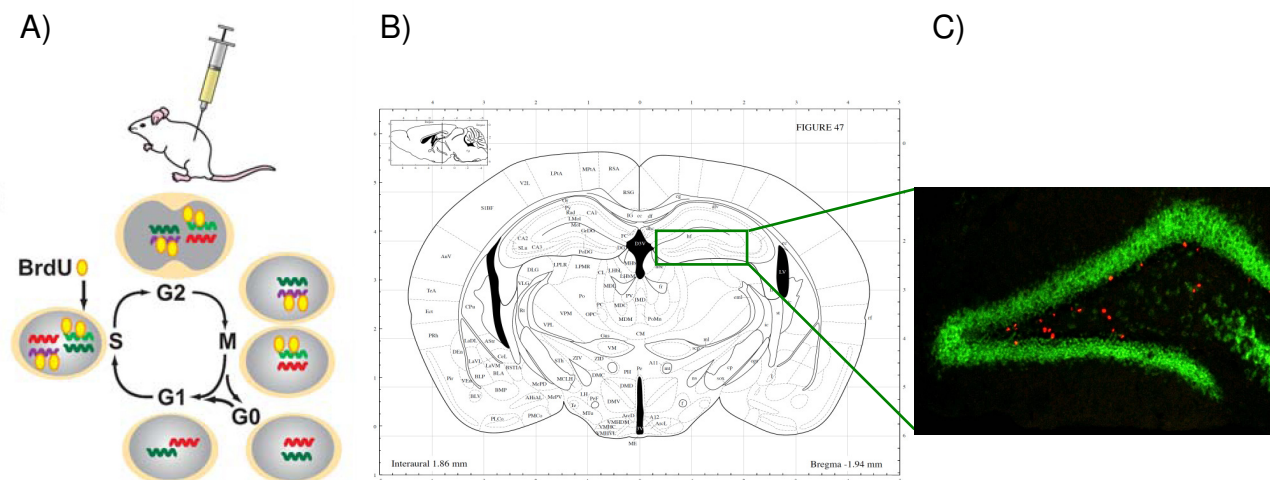


Abb. 2.2 Schematischen Darstellung des immunhistochemischen BrdU Nachweises

- A) Intraperitoneale Applikation von BrdU
 - B) Hippocampaler, koronaler Gewebeschnitt nach erfolgter Differenzierungszeit
 - C) Immunhistochemische Doppelfärbung BrdU positiver (rot) und NeuN positiver (grün) Zellen
- (A: nach Ming und Song, 2005; B: nach Paxinos und Franklin, 2001; C: eigene Aufnahme)

2.6.2 Transkardiale Perfusion

Für immunhistochemische Arbeiten wurden die Tiere transkardial perfundiert. Die Tiere wurden intraperitoneal mit einer Ketamin-Xylazin-Lösung anästhesiert. Nachdem die Mäuse keine Reaktion auf Schmerzreize zeigten, wurde der Thorax geöffnet und der linke Herzventrikel mit einer Kanüle punktiert. Über ein angehängtes Infusionsbesteck wurde innerhalb von 5 min etwa 15 ml eiskalter Phosphatpuffer 1x und im Anschluss dieselbe Menge an 4%iger Paraformaldehydlösung appliziert. Das Abfließen von Blut und Perfusat wurde über einen Einschnitt des rechten Herzvorhofs gewährleistet. Über den Entfärbungszustand der Leber wurde der vollständige Blut-austausch des zentralnervösen Blutes kontrolliert.

2.6.3 Postfixierung des Gewebes

Nach erfolgter Perfusion wurden die Mäuse dekapitiert. Die Gehirne wurden entnommen und für mindestens 24 Stunden in einer 4%igen Paraformaldehydlösung (4°C) inkubiert. Um dem Gewebe osmotisch Wasser zu entziehen und eine weitgehende Zerstörung der Zellen beim Einfrieren zu verhindern wurden, die Gehirne anschließend für 72 Stunden in Sucroslösung (30%) bei 4°C gelagert. Die postfixierten Gehirne wurden in tiefgekühltem Isopentan schockgefroren und bis zum Anfertigen der Schnittserien bei -80°C gelagert.

2.6.4 Anfertigung und Lagerung der Gehirnschnitte

Zum Anfertigen der Schnittserien wurden die Gehirne in Tissue Tek eingebettet. Mit Hilfe des Kryostaten wurden 40 µm dicke, koronale Schnitte des Hippocampus hergestellt. Jeder sechste Schnitt diente der Herstellung einer Schnittserie. Der Hippocampus wurde stets von Bregma -0,940 mm bis Bregma - 3,340 mm geschnitten. Die Schnittserien lagerten bis zur Färbung bei 4°C in Kälteschutzlösung. Alle nachfolgenden Färbungen wurden an frei schwimmenden Schnitten unter ständigem Schütteln durchgeführt. Um eine relative Aussage über die Anzahl positiver Zellen zu gewährleisten, wurden bei jedem Färbedurchgang Gehirnschnitte aller zu vergleichenden Gruppen gleichzeitig gefärbt.

2.6.5 Quantifizierung BrdU-positiver Zellen

Die Quantifizierung BrdU-positiver Zellen erfolgte mit Hilfe der ABC-Methode, die aufgrund ihrer hohen Sensitivität in der Immunhistochemie weit verbreitet ist. Bei diesem Verfahren erkennt ein Primärantikörper das spezifische Antigen im Präparat, hier das interkalierte BrdU. Im Folgeschritt bindet ein Biotin-konjugierter Sekundärantikörper an das FC-Fragment des ersten Antikörpers. Ein zugesetzter Peroxidasegekoppelter Avidin-Biotin-Komplex bindet mit hoher Affinität an das Biotin. Diese Peroxidase setzt bei der anschließenden Färbereaktion eine applizierte DAB-Nickellösung, zu einem unlöslichen, dunklen Niederschlag im Gewebe um, jedoch nur in Anwesenheit von H_2O_2 . Folgendes Färbeprotokoll (Tab. 2.4) wurde verwendet:

Tab.2.4.: Färbeprotokoll zur Quantifizierung BrdU-positiver Zellen

<u>Anzahl</u>	<u>Zeit</u>	<u>Arbeitsschritt</u>	<u>Temperatur</u>
3x	5 min	in TBS 1x waschen	RT
1x	30 min	2 N HCl	37°C
1x	10 min	0,3 N Borsäure	RT
10x	5 min	in TBS 1x waschen	RT
1x	60 min	in TBS-Plus blockieren	RT
1x	ÜN	Inkubation mit Primärantikörper Ratte anti BrdU 1:1500 in TBS-Plus	4°C
3x	10 min	in TBS 1x waschen	RT
1x	30 min	In TBS 1x + 2 Vol% BSA	RT
1x	60 min	Inkubation mit Sekundärantikörper Ziege anti Ratte (biotinyliert) 1:1500 in TBS + 2 Vol% BSA	RT
1x		Ansetzen ABC Reagenz: 3 µl/ml Reagenz A + 3 µl/ml Reagenz B in TBS 1x + 0,5 Vol% BSA	RT (dunkel)
3x	10 min	in TBS 1x waschen	RT
1x		Zugabe ABC Reagenz	RT (dunkel)
3x	10 min	in TBS 1x waschen	RT
1x	5 min	Inkubation in 5 min zuvor angesetzter DAB-Ni Lösung	RT
		Abstoppen der Reaktion mit 0,5 µl/ ml H_2O_2 30%	RT
3x	10 min	in TBS 1x waschen	RT
		Schnitte in Ultrapure Wasser überführen	RT
		Schnitte mit Pinsel auf Objektträger aufziehen	RT
		Eindeckeln in RotiHistoKit II	RT

2.6.6 Charakterisierung BrdU-positiver Zellen

Bei Anwendung der ABC-Färbemethode werden alle BrdU-positiven Zellen angefärbt. Um eine Bestimmung BrdU-positiver Neurone durchzuführen wurde eine Doppelfärbung durchgeführt. Alle Hippocampusschnitte in dieser Versuchsreihe durchliefen sowohl ein Färbeprotokoll für das neuronenspezifische Nukleus Protein (NeuN), als auch eins für BrdU. Anhand dieser Vorgehensweise war eine anschließende Charakterisierung BrdU-positiver Zellen möglich. Für die Doppelfärbung wurde das folgende Protokoll (Tab.2.5) genutzt:

Tab.2.5.: Färbeprotokoll zur Charakterisierung BrdU-positiver Zellen mittels NeuN Doppelfärbung

<u>Anzahl</u>	<u>Zeit</u>	<u>Arbeitsschritt</u>	<u>Temperatur</u>
3x	5 min	in TBS 1x waschen	RT
1x	30 min	2 N HCl	37 °C
1x	10 min	0,3 N Borsäure	RT
10x	5 min	in TBS 1x waschen	RT
1x	60 min	in TBS-Plus blockieren	RT
1x	48 h	Inkubation mit Primärantikörper in TBS-Plus Ratte anti BrdU (1:1500) Maus anti NeuN (1:250) Alexa Fluor 488 konjugiert (alle nachfolgenden Schritte erfolgten im Dunkeln)	4 °C
3x	10 min	in TBS 1x waschen	RT
1x	30 min	In TBS 1x + 2 Vol% BSA	RT
1x	60 min	Inkubation mit Sekundärantikörper in TBS-Plus Ziege anti Ratte (1:500) Alexa Fluor 594	RT
8x	5 min	in TBS 1x waschen	RT
		Schnitte in Ultrapure Wasser überführen	RT
		Schnitte mit Pinsel auf Objektträger aufziehen	RT
		Eindeckeln in Vectashield H-1200 Mounting Medium	RT

2.6.7 Negativkontrolle

Unspezifische Färbungen konnten mit Hilfe einer Negativkontrolle ausgeschlossen werden. Gehirnschnitte, von Tieren ohne BrdU Applikation, wurden dafür bei jeder Färbereihe zusätzlich mitgefärbt. Diese Schnitte dienten dem Ausschluss von unspezifischen Färbesignalen.

2.7 Experimentelles Design

2.7.1 Vorversuch

Der Versuch wurde mit 20 Mäusen der Zuchtline C3H/HeN und zehn C57BL/6J Mäusen durchgeführt. Während der ersten zwei Versuchswochen wurden alle Tiere unter einem 12:12 Stunden Licht-Dunkel Zyklus (LD) gehalten. Nach dieser 14tägigen Habituationsphase wurde für die Hälfte der Mäuse das Lichtintervall von dem 12:12 Stunden Licht-Dunkel Zyklus auf eine konstante Beleuchtung (LL; 24:0 Licht-Dunkel Rhythmus) verändert. Die übrigen Mäuse wurden weiterhin unter dem 12:12 Licht-Dunkel Rhythmus gehalten. Diese Bedingungen wurden für die kommenden acht Wochen beibehalten. Auf diese Weise standen für den Vorversuch vier Versuchstiergruppen zur Verfügung (Tab. 2.6).

Tab.2.6.: Experimentelle Gruppen des Vorversuchs

I	C3H	LD	12:12 Licht-Dunkel Rhythmus	n = 10
II	C57	LD	12:12 Licht-Dunkel Rhythmus	n = 5
III	C3H	LL	24:0 Licht-Dunkel Rhythmus	n = 10
IV	C57	LL	24:0 Licht-Dunkel Rhythmus	n = 5

Das Verhalten der Tiere wurde im Saccharin-Präferenz-Test, dem Offenfeld-Test und dem „*forced-swimming*“-Test bestimmt. Sowohl der Offenfeld-Test (sechs Wochen nach Veränderung der Lichtbedingungen) als auch der „*forced-swimming*“-Test (sieben Wochen nach Veränderung der Lichtbedingungen) wurde mit allen Tieren randomisiert und zur selben Tageszeit durchgeführt. Am Ende der Versuchsreihe wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Die Gehirne wurden entnommen, schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Im Anschluss an die Verhaltensversuche wurden im Labor verschiedene Gehirnareale präpariert und die Expressionsstärke mehrerer Kandidatengene mit Hilfe der qRT-PCR analysiert.

2.7.2 Erstellung eines 24 Stunden Profils

Der Einfluss der Tageszeit auf das Verhalten von C3H/HeN Mäusen in typischen Depressionstests wurde anhand dieser Versuchsreihe ermittelt. Tagesaktivitätsprofile der Mäuse wurden im „*forced-swimming*“-Test, dem „*tail-suspension*“-Test und dem Offenfeld-Test erstellt. Jeder der drei Tests wurde mit insgesamt 96 C3H/HeN Mäusen durchgeführt. Die Testung erfolgte alle drei Stunden mit jeweils 12 naiven Tieren über 24 Stunden hinweg. Zu jedem Depressionstest wurden auf diese Weise acht Messzeitpunkte erhalten. Zur Gewährleistung einer einheitlichen Zeitangabe wird in Bezug zu chronobiologischen Arbeiten der Begriff „Zeitgeberzeit“ (ZT) verwendet. Definitionsgemäß ist ZT 0 dabei der Zeitpunkt in einem Standard 12:12 Stunden Licht-Dunkel Rhythmus, bei dem die Lichtphase beginnt. Die „experimentelle Nacht“ beginnt bei ZT 12 und endet bei ZT 24. ZT 24 ist dabei gleichbedeutend mit ZT 0. Auch für alle folgenden Versuche wurde als Zeitangabe stets die „Zeitgeberzeit“ verwendet. Die Zeitpunkte der einzelnen Testungen sind zur besseren Übersicht in der folgenden Tabelle im Bezug zur Mitteleuropäischen Zeit (MEZ) aufgelistet (Tab. 2.7).

Tab.2.7.: Messzeitpunkte des 24 Stunden Profils

MEZ	8	11	14	17	20	23	2	5
ZT	1	4	7	10	13	16	19	22

Die Depressionstests wurden in Form einer Versuchskaskade durchgeführt. Pro Woche wurde nur ein Test vollzogen. Den Tieren stand damit nach dem absolvierten Test genug Zeit zur Erholung zur Verfügung. Begonnen wurde die Kaskade mit dem Offenfeld-Test. Es folgte der „*tail-suspension*“-Test und der „*forced-swimming*“-Test terminierte die Versuchsreihe. Mit einer Zeitverzögerung von 20 Minuten wurden alle Mäuse nach dem letzten Test durch zervikale Dislokation getötet. Zu bemerken ist, dass im „*forced-swimming*“-Test nur eine Hälfte der Mäuse zu jedem Zeitpunkt getötet wurde. Die andere Hälfte diente als ungestresste Referenz. Auch diese Tiere wurden durch zervikale Dislokation zu den korrespondierenden Testzeitpunkten getötet. Für anschließende Laboruntersuchungen wurden Blutproben entnommen sowie die Gehirne isoliert, schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.7.3 Illuminationsversuch 1

Dieser Versuch wurde mit 40 Mäusen der Line C3H/HeN durchgeführt. Für die initiale, zweiwöchige Habituationsphase wurden alle Tiere unter einem 12:12 Stunden Licht-Dunkel (LD) Intervall gehalten. Während dieser Zeit wurde die Sucrose-Präferenz von allen Tieren als Referenzwert (Basis) bestimmt. Nach den 14 Tagen wurden die Mäuse auf zwei Gruppen aufgeteilt. Eine Mäusegruppe wurde weiterhin unter dem LD Rhythmus gehalten. Die andere Gruppe wurde einem 22:02 Stunden Licht-Dunkel (LL) Rhythmus ausgesetzt. Nach zwei weiteren Wochen wurden diese beiden Gruppen nochmals in zwei Subpopulationen unterteilt. Auf diese Weise entstanden vier experimentelle Gruppen. Jeweils eine Subpopulation bekam das Antidepressivum (AD) Imipramin (20 mg/kg/Tag) über das Trinkwasser verabreicht. Die andere Subpopulation bekam weiterhin Wasser ohne Zusatz zu trinken. Diese vier Gruppen wurden bis zum Versuchsende beibehalten und gliederten sich wie folgt (Tab. 2.8):

Tab.2.8.: Experimentelle Gruppen des Vorversuchs

I	C3H	LD	12:12 Stunden Licht-Dunkel Rhythmus	n = 10
II	C3H	LD-AD	12:12 Stunden Licht-Dunkel Rhythmus	n = 10
III	C3H	LL	22:02 Stunden Licht-Dunkel Rhythmus	n = 10
IV	C3H	LL-AD	22:02 Stunden Licht-Dunkel Rhythmus	n = 10

Die Aktivität der Tiere in ihrem Heimkäfig wurde kontinuierlich über die ganze Versuchsdauer bestimmt. Ferner wurde das Verhalten der Tiere in depressionsassoziierten Tests analysiert. Es wurden der Sucrose-Präferenz-Test und der Offenfeld-Test durchgeführt. Da die Verlängerung der Lichtphase zu einer reduzierten Allgemeinaktivität der Tiere führte, wurde der Offenfeld-Test während der Ruhephase der Tiere durchgeführt. Die Ruhephasen aller Tiere wurden durch Auswertung der Heimkäfigaktivitätsdaten vom Vortag bestimmt. Ruhephasen von Tieren unter LD Bedingungen lagen stets bei ZT 4 (entspricht MEZ um 11:00 Uhr morgens). Bei Mäusen unter LL Haltungsbedingungen, richtete sich die Ruhephase nach ihrem individuellen Zeitempfinden. Zum Zeitpunkt des Offenfeld-Tests lag die Ruhephase der LL Versuchstiere bei ZT 19 (entspricht 3:00 Uhr morgens).

Der wöchentliche Ablauf dieser Versuchsreihe ist in Abb.2.3 dargestellt.

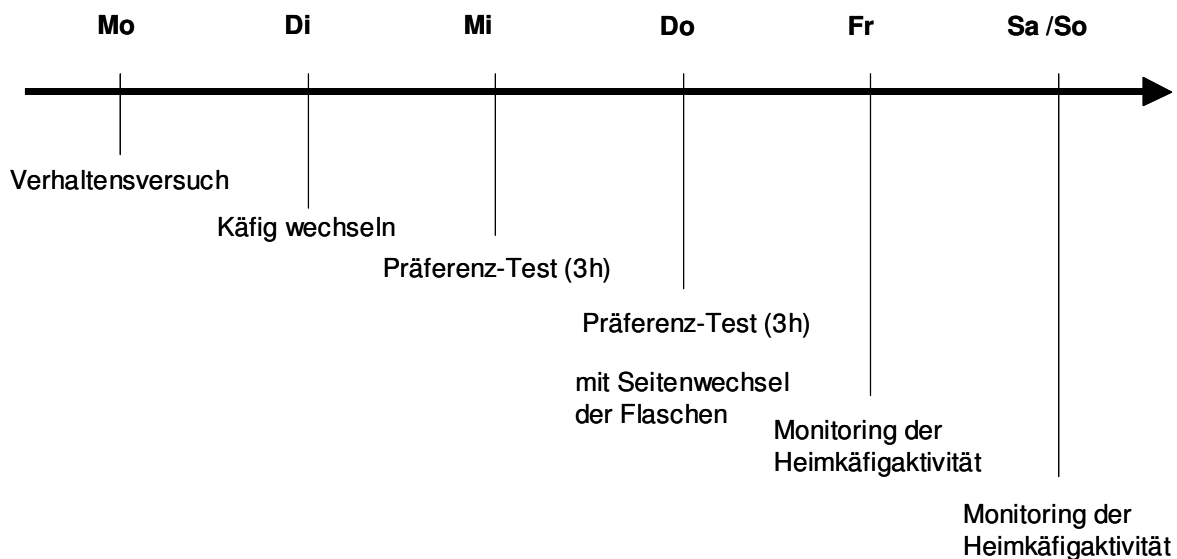


Abb. 2.3

Schematische Darstellung des wöchentlichen Versuchsablaufs

Am Ende der sechswöchigen Versuchsdauer wurden zehn Tiere aus jeder Versuchsgruppe durch zervikale Dislokation um 10:00 Uhr morgens (ZT 3) getötet. Das Blut dieser Mäuse wurde für eine anschließende Serumanalyse der Corticosteronwerte aufbewahrt. Die Gehirne und Nebennieren wurden schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Genexpression in verschiedenen Gehirnarealen wurde anschließend im Labor mittels qRT-PCR analysiert und der hippocampale Gehalt an BDNF Protein mittels EIA bestimmt.

Zusätzlich zu den getesteten Tieren wurden in dieser Versuchreihe 20 Mäuse am Ende der sechswöchigen Versuchsreihe für den immunhistochemischen Nachweis teilungsaktiver Zellen genutzt. Diese Tiere wurden unter den vier verschiedenen Versuchsbedingungen gehalten, absolvierten jedoch keinerlei Verhaltenstests. Jeweils fünf Tiere der einzelnen Versuchsgruppen bekamen BrdU appliziert und wurden anschließend zwei weitere Wochen unter der jeweiligen Versuchsbedingung gehalten. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Tiere transkardial perfundiert und die Gehirne bei -80 °C gelagert.

2.7.4 Illuminationsversuch 2

Dieser Versuch diente primär der unabhängigen Reproduktion der Ergebnisse aus dem Illuminationsversuch 1. Die Variation bei diesem Versuch bestand darin, dass C3H/HeN Mäuse unter einem 12:12 Stunden Licht-Dunkel Intervall mit Tieren die einem 24:0 Stunden Licht-Dunkel Rhythmus ausgesetzt waren, verglichen wurden. Eine weitere Variation bestand darin, dass die Mäuse mit dem selektiven Serotonin Rückaufnahmehemmer Fluoxetin (F; Fluoxetinkonzentration 10 mg/kg/Tag) über das Trinkwasser behandelt wurden und nicht das trizyklische Antidepressivum Imipramin bekamen. Zusätzlich wurden in dieser Versuchsreihe Mäuse untersucht, denen melatoninhaltiges Trinkwasser (M; Melatoninkonzentration 1,5 mg/kg/Tag) zur Verfügung stand. Es ergaben sich so insgesamt sechs Versuchstiergruppen, die aus jeweils 10 Tieren bestanden (Tab.2.9).

Tab.2.9.: Experimentelle Gruppen des Vorversuchs

I	C3H	LD W	12:12 Stunden Licht-Dunkel Rhythmus	n = 10
II	C3H	LD F	12:12 Stunden Licht-Dunkel Rhythmus	n = 10
III	C3H	LD M	12:12 Stunden Licht-Dunkel Rhythmus	n = 10
IV	C3H	LL W	24:0 Stunden Licht-Dunkel Rhythmus	n = 10
V	C3H	LL F	24:0 Stunden Licht-Dunkel Rhythmus	n = 10
VI	C3H	LL M	24:0 Stunden Licht-Dunkel Rhythmus	n = 10

Die Versuchsdauer des Illuminationsversuchs 2 betrug sechs Wochen. Während dieser Zeit wurde von den 60 Mäusen die Heimkäfigaktivität und die Sucrose-Präferenz bestimmt. Ferner wurde der Offenfeld-Test durchgeführt, die Aktivität der Tiere nach Konfrontation mit einem neuen Heimkäfig ermittelt sowie die soziale Affinität der Mäuse analysiert. Als weitere Parameter wurde zweimal wöchentlich (Montag und Freitag) das Körpergewicht und der Futterkonsum aller Tiere bestimmt. Die Zeitpunkte der Verhaltensversuche richteten sich, wie schon im Illuminationsversuch 1, nach der jeweiligen Ruhephase der Versuchsgruppe. Als molekularbiologische Analysen schlossen sich Microarray Analysen der Gewebe des präfrontalen Kortex sowie deren Validierung mittels qRT-PCR an.

2.7.5 Illuminationsversuch 3

Neben genetischer Prädisposition und strukturellen Umgebungseinflüssen sind auch individuelle psychosoziale Rahmenbedingungen in der Lage, die physische Gesundheit einzuschränken oder zu fördern. Um den Einfluss sozialer Isolation auf die ermittelte, depressionsähnliche Symptomatik in den vorherigen Versuchen abzuwägen, wurde der Illuminationsversuch 3 durchgeführt. Für dieses Experiment wurden 72 C3H/HeN Mäuse in Käfigen zu jeweils sechs Tieren gehalten. Ihr Verhalten wurde im Heimkäfig und im Offenfeld-Test bestimmt. Alle Tiere waren zu Beginn der Versuchsreihe zwei Wochen einem 12:12 Stunden Licht-Dunkel Intervall ausgesetzt. Anschließend wurde die eine Hälfte der Tiere unter einem 22:02 Stunden Licht-Dunkel Intervall gehalten, während die andere Hälfte weiterhin unter einem 12:12 Stunden Licht-Dunkel Rhythmus lebte. Diese Gruppeneinteilung wurde für die sechswöchige Versuchsdauer beibehalten und gliederte sich wie folgt (Tab. 2.10):

Tab.2.10.: Experimentelle Gruppen des Vorversuchs

I	C3H	LD	12:12 Stunden Licht-Dunkel Rhythmus	n = 36
II	C3H	LL	22:02 Stunden Licht-Dunkel Rhythmus	n = 36

Zusätzlich zur Heimkäfigaktivität und dem Offenfeld-Test wurde das Angstverhalten aller Tiere im „*novelty suppressed feeding*“-Test bestimmt und Blutproben für eine anschließende Corticosteronbestimmung entnommen. Eine weitere Besonderheit des Illuminationsversuchs 3 bestand darin, dass sowohl der Offenfeld-Test, als auch der „*novelty suppressed feeding*“-Test zu verschiedenen Tageszeiten durchgeführt wurde. Auch die Entnahme der Blutproben erfolgte zu unterschiedlichen ZT Zeiten. Zusätzlich zu diesen Analysen bekamen 12 Tiere aus jeder Gruppe am Ende der Versuchsreihe BrdU appliziert. Die Gehirne dieser Tiere wurden zwei Wochen nach der letzten BrdU Injektion entnommen und bei –80 °C gelagert.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte der Einfluss einer deutlich verlängerten Lichtperiode auf das Verhalten von nachtaktiven Mäusen im Kontext depressionsähnlicher Symptome untersucht werden. Dafür wurden fünf unabhängige Experimente durchgeführt, deren Ergebnisse im Folgenden dargestellt werden.

3.1 Vorversuch

Im Rahmen des Vorversuchs wurde untersucht, ob eine Dauerbeleuchtung bei Verwendung von zwei verschiedenen Mausinzuchtlinien zu unterschiedlichen Testergebnissen führt. Analysiert wurden melatoninprofiziente C3H/HeN Mäuse und die für biochemische Analysen und Verhaltensstudien sehr häufig genutzten melatonindefizienten C57BL/6J Mäuse.

3.1.1 Saccharin-Präferenz-Test

Der Präferenz-Test für süße Lösungen dient der Ermittlung von anhedonischem Verhalten der Versuchstiere. Es zeigte sich, dass die veränderte Lichtbedingung keinen Einfluss auf das Konsumverhalten der melatonindefizienten C57BL/6J Mäuse hatte (Abb. 3.1 A).

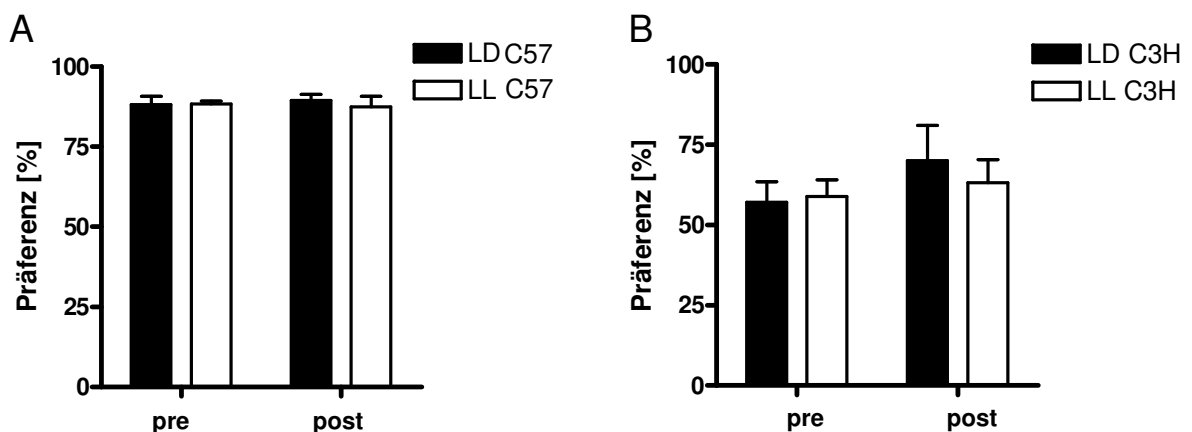


Abb. 3.1 Saccharin-Präferenz

Ermittlung der Saccharinpräferenz zu Versuchsbeginn (pre) und am Ende der Versuchsreihe (post) bei C57BL/6J und C3H/HeN Mäusen unter verschiedenen Beleuchtungsbedingungen.

A) Melatonindefiziente C57BL/6J Mäuse konsumierten bereits zu Versuchsbeginn mehr von der Saccharinlösung als vom Wasser und zeigten eine deutliche Präferenz. Das Präferenzverhalten dieser Tiere wurde nicht durch die Verlängerung des Lichtintervalls beeinflusst. Es konnte kein Effekt durch die Veränderung des Lichtintervalls ermittelt werden.

B) Im Gegensatz dazu zeigten melatoninprofiziente C3H/HeN Mäuse zu Versuchsbeginn keine Präferenz für die süße Lösung. Dieses Verhalten änderte sich nicht bis zum Ende der Versuchsreihe. Die Tierzahl betrug pro Gruppe $n=10$ für C3H und $n=5$ für C57 Mäuse. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes. Weiße Balken symbolisieren LL, schwarze LD Haltungsbedingungen. (ANOVA mit Messwiederholung).

Zu Beginn des Versuches zeigten alle C57BL/6J Mäuse eine deutliche Präferenz für die süße Lösung und tranken davon wesentlich mehr als vom Wasser (LD C57: 88,18% \pm 2,53; LL C57: 88,30% \pm 0,93). Die Messung der konsumierten Flüssigkeiten am Ende der Versuchsreihe belegte, dass alle C57BL/6J Mäuse weiterhin die Saccharinlösung bevorzugten. (LD C57: 87,36% \pm 3,33; LL C57: 89,38% \pm 1,94). Die sechswöchige Veränderung der Lichtbedingung führte bei den melatonindefizienten C57BL/6J Mäusen nicht zu einer depressionsassoziierten Anhedonie. Ferner konnte kein Unterschied im Konsumverhalten von LL C57 und LD C57 Mäusen festgestellt werden.

Bei C3H/HeN Mäusen wurde in diesem Test kein signifikanter Effekt der Beleuchtungsdauer auf das Konsumverhalten der Tiere ausgemacht (Abb. 3.1 B). Allerdings lagen die Präferenzwerte aller melatoninprofizienten Tiere zu Beginn der Versuchsreihe bei etwa 60% (LD C3H: 59,51% \pm 5,45; LL C3H: 61,53% \pm 4,85). Nach sechswöchiger Veränderung der Lichtbedingungen konnte kein Unterschied im Konsumverhalten der C3H/HeN Mäuse erkannt werden (LD C3H 70,05% \pm 11,02; LD C3H 63,21% \pm 7,18). Auffällig war jedoch, dass sich das Präferenzverhalten der melatoninprofizienten C3H/HeN Mäuse bereits zu Beginn der Versuchsreihe signifikant von dem der melatonindefizienten C57BL/6J Mäuse unterschied (LD C57: 88,18% \pm 2,53; LD C3H: 59,51% \pm 5,45; $p < 0,001$). C3H/HeN Mäuse zeigten eine geringere Präferenz für die 1%ige Saccharinlösung als die C57BL/6J Mäuse. Sie konsumierten bereits zu Beginn der Versuchsreihe aus beiden Trinkflaschen etwa gleich viel Flüssigkeit. Der hedonische Wert der verwendeten Saccharinlösung war demnach für C3H/HeN Mäuse so gering, dass sie die süße Lösung gegenüber dem Wasser nicht präferierten.

3.1.2 Offenfeld-Test

Der Offenfeld-Test dient der Bestimmung von Emotionalität bei Ratten und Mäusen (Archer, 1973). Da eine lokomotorische Hyperaktivität im Offenfeld in verschiedenen Depressionsmodellen durch die chronische Gabe von Antidepressiva reduziert wird, kann eine erhöhte Aktivität von Nagern im Offenfeld als Depressionssymptomatik interpretiert werden. Hyperaktivität im Offenfeld-Test dient demnach als ein Bewertungskriterium für affektive Störungen.

Horizontale Aktivität

LL C3H Mäuse legten während der ersten 5 Minuten in diesem Testes eine signifikant größere Distanz zurück, als LD C3H Tiere (LD: 30,3 cm \pm 2,46; LL: 42,2 cm \pm 4,21; $p < 0,05$) (Abb. 3.2 A). Das hyperaktive Verhalten schwächte sich mit voranschreitender Versuchsdauer ab. Im letzten Zeitintervall legten LL und LD Mäuse dieser Zuchtlinie vergleichbare Distanzen zurück (LD: 27,3 cm \pm 1,15; LL: 29,76 cm \pm 2,33). Im Gegensatz dazu konnte bei melatonindefizienten C57BL/6J Mäusen kein Einfluss der veränderten Lichtbedingung festgestellt werden (Abb. 3.2 B). LD und LL Mäuse dieser Zuchtlinie legten bereits in den ersten 5 Minuten vergleichbare Distanzen zurück (LD: 52,06 cm \pm 3,91; LL: 52,82 cm \pm 4,89). Auffällig war, dass bei C57BL/6J Mäusen keine Abnahme der horizontalen Aktivität während der gesamten Versuchsdauer auftrat.

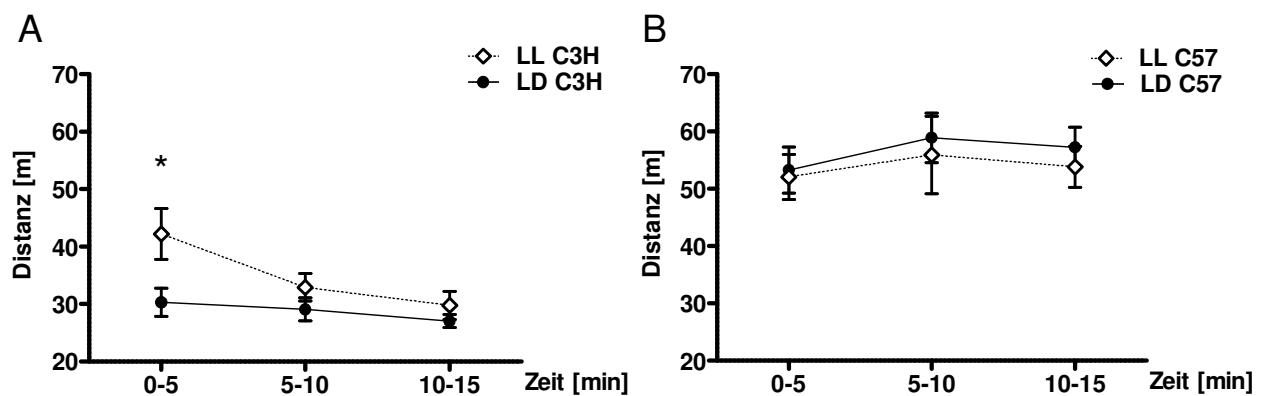


Abb. 3.2 Horizontale Aktivität der Mauslinien im Offenfeld-Test

Analyse der lokomotorischen Aktivität von C3H/HeN und C57BL/6J Mäusen nach 4 Wochen unter verschiedenen Beleuchtungsbedingungen.

A) Die zurückgelegte Distanz von C3H Mäusen unter LL Bedingungen war innerhalb der ersten 5 Minuten signifikant höher als die der C3H Mäuse unter LD Bedingungen. Dieser Effekt schwächte sich mit fortschreitender Versuchsdauer ab. Kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen war in den Zeitintervallen 5-10 und 10-15 zu ermitteln.

B) Bei C57 Mäusen konnte im Gegensatz zu C3H Mäusen in keinem der drei Zeitintervalle ein Beleuchtungseffekt festgestellt werden.

Die Tierzahl betrug pro Gruppe $n=10$ für C3H und $n=5$ für C57 Mäuse. Abgebildet sind Mittelwerte und \pm Standardfehler des Mittelwertes. Weiße Rauten symbolisieren LL, schwarze Punkte LD Haltungsbedingungen. * $p < 0,05$ (ANOVA mit Messwiederholungen gefolgt von Fischer LSD *Post-hoc* Test).

Ein Vergleich der horizontalen Aktivität beider Inzuchtmauslinien unter LD-Bedingungen spiegelt den genetischen Einfluss auf das Aktivitätsverhalten der Tiere wieder. C57BL/6J Mäuse waren im Vergleich zu C3H/HeN Mäusen in den ersten fünf Minuten des Tests aktiver und legten in der gleichen Zeit etwa die doppelte Strecke zurück (C57BL/6J: 52,06 cm \pm 3,91; C3H/HeN: 30,3 cm \pm 2,46; $p < 0,001$).

Vertikale Aktivität

Die Auswertung zur vertikalen Aktivität der melatoninprofizienten C3H/HeN Mäuse zeigte, dass sich LL Tiere während der 15 Minuten signifikant häufiger auf ihre Hinterbeine stellten als Mäuse unter LD Bedingungen (LL C3H: $147,89 \pm 15,86$; LD C3H: $100,33 \pm 15,04$; $p < 0,05$) (Abb. 3.3 A). Dieses Phänomen konnte bei C57BL/6J Mäusen nicht festgestellt werden (Abb. 3.3 B). Die Häufigkeit, mit der sich melatonindefiziente Tiere während der gesamten Versuchszeit aufrichteten, war von der jeweiligen Beleuchtungsdauer unabhängig (LL C57: $157,86 \pm 16,65$; LD C57: $162,9 \pm 12,61$). Eine Verlängerung der Lichtperiode führte bei diesem Mausstamm zu keiner veränderten Aktivität. Ein Vergleich von melatoninprofizienten und melatonindefizienten Mäusen unter LD Haltungsbedingungen zeigte auch beim Vergleich der vertikalen Aktivität einen Einfluss des genetischen Hintergrundes. Melatonindefiziente C57BL/6J Tiere richteten sich während der Versuchsdauer signifikant häufiger auf als melatoninprofiziente C3H/HeN Mäuse (LD C57: $162,9 \pm 12,61$; LD C3H: $100,33 \pm 15,04$; $p < 0,05$).

Die unterschiedlichen Lichtbedingungen beeinflussten das Verhalten der melatoninprofizienten C3H/HeN Mäuse, aber nicht das Verhalten der melatonindefizienten C57BL/6J Mäuse.

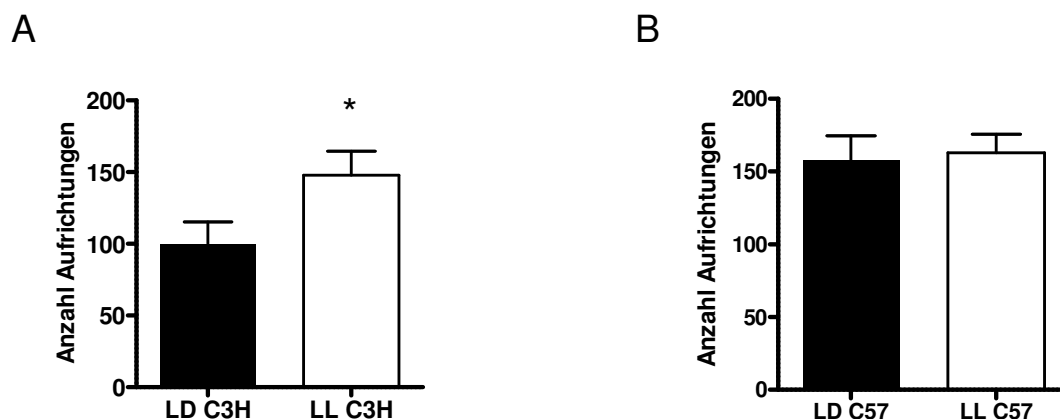


Abb. 3.3 Vertikale Aktivität der Mauslinien im Offenfeld-Test

Analyse der lokomotorischen Aktivität von C3H/HeN und C57BL/6J Mäusen nach 4 Wochen unter verschiedenen Beleuchtungsbedingungen.

A) Die Anzahl an Aufrichtungen von C3H Mäusen unter LL Bedingungen war signifikant höher als die der C3H Mäuse unter LD Bedingungen.

B) Im Gegensatz dazu richteten sich C57 Mäuse während der Versuchsdauer etwa gleich häufig auf. Ein Effekt der unterschiedlichen Lichtbedingungen wurde bei dieser Mauslinie nicht detektiert.

Die Tierzahl betrug pro Gruppe C3H: $n=10$ und C57: $n=5$. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes. Weiße Balken symbolisieren LL, schwarze LD Haltungsbedingungen.

* $p < 0,05$ (Student t-Test, ungepaart, zweiseitig).

3.1.3 „forced swimming“-Test

Depressionsähnliches Verhalten wurde mit Hilfe des FST untersucht. Dazu wurde die jeweilige Immobilitätszeit additiv über die vierminütige Testdauer erfasst (Abb.3.4).

Statistisch signifikante Unterschiede im Verhalten innerhalb der einzelnen Mauslinien waren nur bei C57BL/6J Tieren zu ermitteln. Diese LL Mäuse waren weniger immobil als die LD Kontrollmäuse (LL C57: 108,4 s \pm 22,21; LD C57: 149,8 s \pm 5,15; $p < 0,05$). Bei Mäusen des Inzuchtstammes C3H/HeN war kein signifikanter Effekt der Lichtbedingungen auf das Verhalten nachweisbar (LL C3H: 40,33 s \pm 8,9; LD C3H 76,77 s \pm 13,34). Ein anschließender Vergleich des Immobilitätsverhaltens beider Mauslinien unter LD Bedingungen wies auf genetisch bedingte Unterschiede im Immobilitätsverhalten hin ($p < 0,01$). Mäuse der C3H/HeN Linie zeigten während der vierminütigen Testzeit viel Aktivität und waren wenig immobil (76,78 s \pm 13,34). Im Gegensatz dazu war die gemessene Immobilität bei C57BL/6J LD Mäusen im gleichen Zeitintervall etwa doppelt so hoch (149,8 s \pm 5,15).

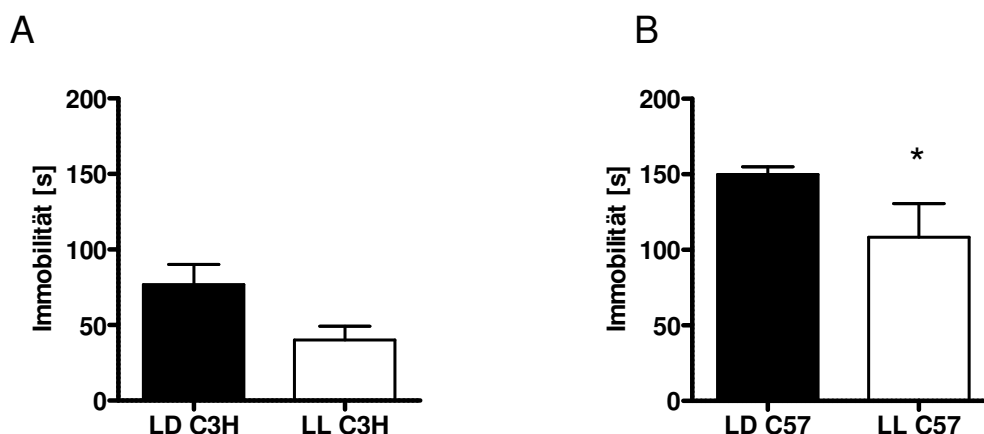


Abb. 3.4 Immobilität der Mauslinien im „forced-swimming“-Test

Analyse der Immobilität von C3H/HeN und C57BL/6J Mäusen nach fünf Wochen unter verschiedenen Beleuchtungsbedingungen.

A) Bei C3H Mäusen konnte kein signifikanter Einfluss des veränderten Lichtzyklus auf das Immobilitätsverhalten festgestellt werden.

B) C57 Mäuse unter LL Bedingungen zeigten dagegen eine signifikant reduzierte Immobilität in diesem Test.

Die Tierzahl betrug pro Gruppe $n=10$ für C3H und $n=5$ für C57 Mäuse. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes. Weiße Balken symbolisieren LL, schwarze LD Haltungsbedingungen. * $p < 0,05$ (Student t-Test, ungepaart, zweiseitig).

3.1.4 qRT-PCR

An der Regulation der Stressantwort ist maßgeblich die Hypophysen-Hypothalamus-Nebennieren- (HHN-) Achse beteiligt. Eine Beeinträchtigung ihrer Funktionsweise wird im Zusammenhang mit der Ätiologie von Depressionserkrankungen diskutiert (Nemeroff, 1988; Sapolsky, 2000; Nestler *et al.*, 2002). Die Ursache wird in einer Fehlsteuerung des CRH Systems vermutet. Aus diesem Grund wurde das Expressionsmuster von regulativen Genen der HHN-Achse (CRH, CRHBP, CRH R1 und CRH R2) in verschiedenen Gehirnarealen der C3H/HeN Mäuse mit Hilfe der qRT-PCR untersucht. Die Transkriptmengen wurden im präfrontalen Kortex, dem Hippocampus und der Amygdala analysiert. In allen untersuchten Gehirnregionen war die Expression von CRH, CRHBP und CRH R1 zu detektieren (Abb. 3.5). Die Expressionsstärke von CRH R2 lag in den ausgewählten Gehirnregionen unterhalb der Nachweisgrenze.

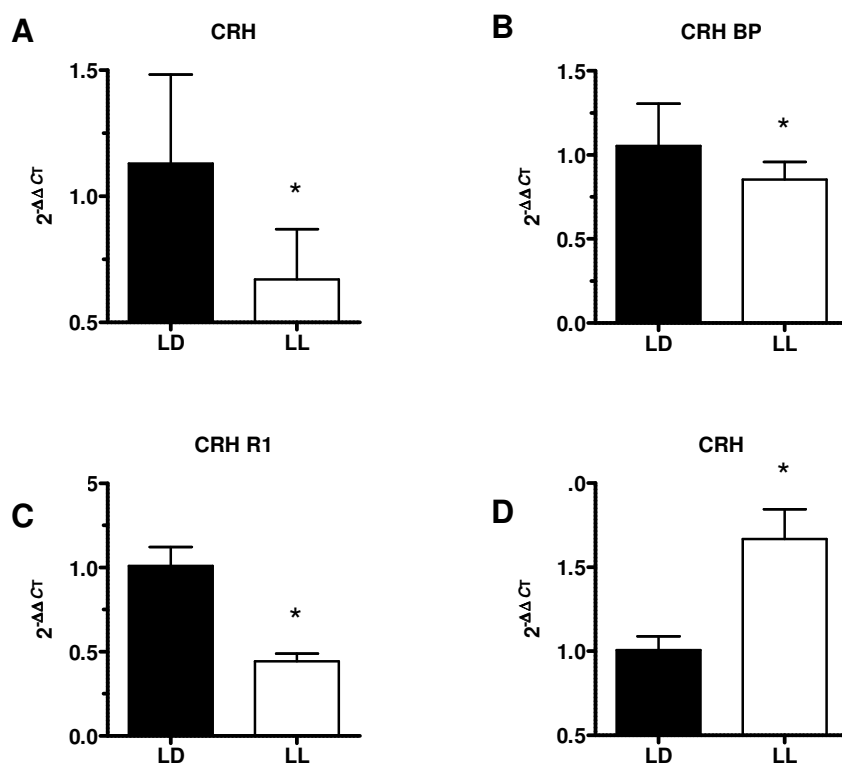


Abb. 3.5 Expression von Transkripten der HHN-Achse im ZNS von C3H Mäusen

Quantitative Auswertung von Kandidatengenen aus isolierter gesamt-RNA von C3H/HeN Mäusen sechs Wochen nach Veränderung der Lichtbedingungen. (A & B) Hippocampus, (C) Amygdala und (D) mPFC. Die unterschiedlichen Beleuchtungsbedingungen resultierten in einer signifikant veränderten Expression von Genen der HHN-Achse in den jeweils dargestellten Gehirnregionen. Die Tierzahl betrug für C3H Mäuse $n=4$ pro Gruppe. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes. Weiße Balken symbolisieren LL, schwarze LD Haltungsbedingungen. * $p<0,05$ (Mann-Whitney U-Tests, ungepaart, zweiseitig).

Die statistische Auswertung belegte, dass die konstante Beleuchtung die Expression des CRH Gens im Hippocampus signifikant reduzierte (LL C3H vs. LD C3H; $p < 0,05$). Eine erniedrigte Expression des CRHBP Gens wurde ebenfalls im Hippocampus festgestellt (LL C3H vs. LD C3H; $p < 0,05$). In der Amygdala war kein Unterschied in der Anzahl der Transkripte des CRH und CRHBP Gens zu belegen. Dafür lag in dieser Gehirnregion die CRH R1 mRNA signifikant reduziert vor (LL C3H vs. LD C3H; $p < 0,05$). Im präfrontalen Kortex (mPFC) konnte keine veränderte Transkriptmenge des CRH R1 Gens festgestellt werden, dafür aber eine verstärkte Expression des CRH Gens (LL C3H vs. LD C3H; $p < 0,05$). Die veränderten Transkriptmengen von regulativen Genen der HHN-Achse lassen eine Beteiligung der CRH Expression bei der Verhaltensmodulation vermuten.

Zusätzlich zu der Expression von Komponenten des CRH Systems wurde der Anteil der beiden RNA-Transkripte *Prkce* und *Homer1* im mPFC bestimmt. Diese Kandidatengene wurden gewählt, da beide eine signifikante Änderung nach chronisch mildem Stress in einer Genexpressionsstudie vom präfrontalen Kortex bei Ratten aufwiesen (Orsetti *et al.*, 2008). Auch in dem vorliegenden Versuch waren die RNA-Mengen beider Transkripte signifikant verändert (Abb. 3.6). *Prkce* Transkriptmengen waren in der LL Gruppe reduziert (LL C3H vs. LD C3H; $p < 0,05$), während *Homer1* Transkripte deutlich vermehrt vorlagen (LL C3H vs. LD C3H; $p < 0,05$).

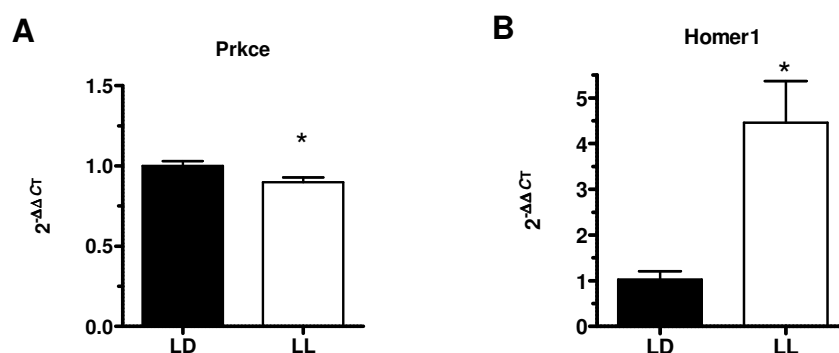


Abb. 3.6 Expression von weiteren Kandidatengenen im mPFC bei C3H Mäusen

Quantitative Auswertung von zwei Transkripten in isolierter gesamt-RNA von C3H/HeN Mäusen sechs Wochen nach Veränderung der Lichtbedingungen.

Während die *Prkce* mRNA unter LL Bedingungen signifikant reduziert vorlag (A), konnte eine deutlich erhöhte Menge des *Homer1* Transkripts (B) in Proben von Tieren unter LL Haltingsbedingungen jeweils im Vergleich zu der Expression von LD Tieren detektiert werden.

Die Tierzahl betrug für die C3H Mäuse $n=4$ pro Gruppe. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes. Weiße Balken symbolisieren LL, schwarze LD Haltingsbedingungen.

* $p < 0,05$ (Mann-Whitney U-Test, ungepaart, zweiseitig).

3.2 24 Stunden Profil

In diesem Experiment wurde untersucht, ob das detektierte Verhalten von C3H/HeN Mäusen in gut etablierten und häufig genutzten Depressionstests stabil und unabhängig von dem Testzeitpunkt reproduziert werden kann. Alle Mäuse für diesen Versuch befanden sich unter einem 12:12 Stunden Licht-Dunkel Rhythmus. Stets naive Mäuse wurden zu vier Zeitpunkten während ihrer Ruhephase (ZT 1, 4, 7 und 10) und vier Zeitpunkten während ihrer aktiven Phase (ZT 13, 16, 19 und 22) im Offenfeld-Test, dem „forced-swimming“-Test und dem „tail-suspension“-Test analysiert. Überraschenderweise zeigte sich in allen gewonnenen 24 Stunden Profilen, dass die Testergebnisse stark von der jeweiligen Tageszeit abhingen.

3.2.1 Offenfeld-Test

Die Performance der Tiere im Offenfeld-Test war deutlich von der für den Versuch gewählten Uhrzeit abhängig. Sowohl die Messwerte zur zurückgelegten Distanz (Abb.3.7) als auch die Anzahl an Aufrichtungen (Abb.3.8) variierten in Abhängigkeit zur Tageszeit. Je nach gewähltem Tageszeitpunkt legten die Tiere während der zehnminütigen Versuchszeit im Offenfeld unterschiedlich große Distanzen zurück ($F_{(7, 24)}=3,47$; $p<0,05$), die nicht mit der aktiven Phase oder Ruhephase korrelierten. Im Vergleich zu allen übrigen Testzeitpunkten legten die Tiere in der Mitte der Ruhephase, zu ZT 7, die geringste Distanz zurück, während zu Beginn der Ruhephase (ZT 1) die größten Distanzwerte ermittelt wurden.

Tab.3.1. Post- hoc Signifikanzwerte

ZT Zeit	1	4	7	10	13	16	19	22
1		0,55	0,01	0,08	0,00	0,04	0,29	0,67
4			0,05	0,24	0,01	0,12	0,64	0,31
7				0,40	0,51	0,65	0,13	0,00
10					0,14	0,69	0,48	0,03
13						0,27	0,03	0,00
16							0,27	0,01
19								0,14
22								

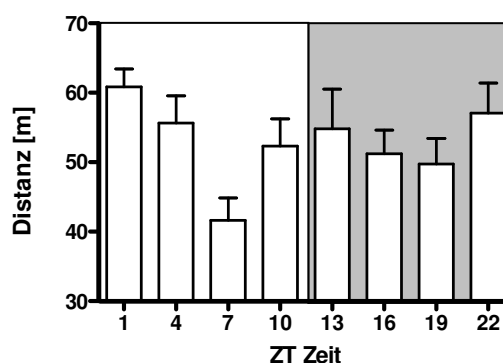


Abb. 3.7 24 Stunden Profil von C3H/HeN Mäusen im Offenfeld-Test

Die jeweils gewählte Tageszeit hatte einen deutlichen Einfluss auf die zurückgelegte Distanz naiver C3H/HeN Mäuse im Offenfeld-Test. Selbst innerhalb der aktiven Phase oder der Ruhephase wurden signifikant unterschiedliche Testergebnisse zu den einzelnen Versuchszeitpunkten erzielt.

Das graue Rechteck hinter dem Graph symbolisiert die aktive Phase (Dunkelphase) der Tiere, das weiße Rechteck die Ruhephase (Hellphase). Die Tierzahl betrug je Testzeitpunkt $n=12$. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes. Tabellarisch sind die p Werte des Post-hoc Tests angegeben. Rote Ziffern markieren signifikante Werte $<0,05$. (ANOVA mit Messwiederholungen gefolgt von Fischer LSD Post-hoc Test).

Der anschließende Fisher LSD *Post-hoc* Vergleich (Tab.3.1.) für die zurückgelegte Distanz belegte in Übereinstimmung mit diesen Befunden signifikante Unterschiede bereits innerhalb der Ruhephase. Messwerte zu ZT 7 unterschieden sich von Werten zu ZT 1 und 4, die ebenfalls in der Ruhephase der Tiere lagen, sowie von den Messergebnissen zu ZT 13 und 22 in der Dunkelphase. Die Ergebnisse von ZT 1 waren außer zu ZT 7 jedoch nur zu dem Messzeitpunkt ZT 19 in der Dunkelphase unterschiedlich.

In Übereinstimmung mit diesen Befunden wichen auch die Messergebnisse zur Anzahl an Aufrichtungen signifikant voneinander ab (Abb.3.8). Die Häufigkeit mit der sich die Tiere innerhalb der zehn Testminuten auf ihre Hinterbeine aufrichteten variierte in Abhängigkeit zum jeweiligen Testzeitpunkt ($F_{(7, 88)}=2.19$; $p<0,05$). Der anschließende Fisher LSD *Post-hoc* Vergleich (Tab.3.2.) belegte, dass sich die Anzahl der Aufrichtungen zu den Zeitpunkten ZT 1 und ZT 7 deutlich von den übrigen Messzeitpunkten unterschied. Obwohl beide Messzeitpunkte in der Ruhephase der Tiere lagen, waren die Messwerte zu ZT 7 signifikant kleiner als zu ZT 10 und 13, während die Werte zu ZT 1 signifikant größer als zu ZT 7, 16 und 19 waren.

Die Messergebnisse zu beiden Parametern: zurückgelegte Distanz und Anzahl der Aufrichtungen zeigten, dass die Testergebnisse stark von dem gewählten Test-Tageszeitpunkt abhingen. Messwerte kurz nach Beginn (ZT 1) und in der Mitte (ZT 7) der Lichtphase waren in diesem Versuch besonders unterschiedlich und wichen zudem deutlich von den übrigen Messwerten ab.

Tab.3.2. *Post- hoc* Signifikanzwerte

ZT Zeit	1	4	7	10	13	16	19	22
1		0,09	0,00	0,32	0,27	0,03	0,02	0,08
4			0,08	0,48	0,56	0,62	0,47	0,97
7				0,02	0,02	0,21	0,30	0,09
10					0,90	0,23	0,15	0,45
13						0,28	0,19	0,53
16							0,82	0,65
19								0,49
22								

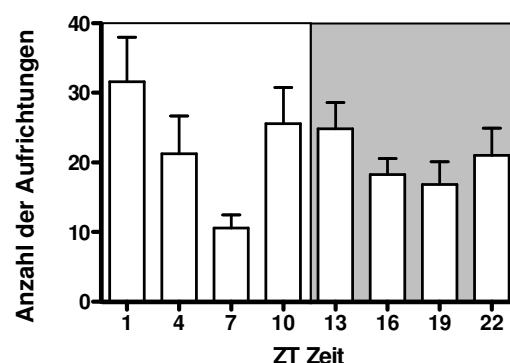


Abb. 3.8 24 Stunden Profil von C3H/HeN Mäusen im Offenfeld-Test

Die Summe der Aufrichtungen von C3H/HeN Mäusen im Offenfeld variiert innerhalb der zehn Testminuten in Abhängigkeit zur Tageszeit. Während zu ZT 1, am Beginn in der Ruhephase, die Anzahl an Aufrichtungen am höchsten war, wurde keine sechs Stunden später, zu ZT 7, der kleinste Wert der Messreihe detektiert.

Das graue Rechteck hinter dem Graph symbolisiert die aktive Phase (Dunkelphase) der Tiere, das weiße Rechteck die Ruhephase (Hellphase). Die Tierzahl betrug je Testzeitpunkt $n=12$. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes. Tabellarisch sind die p Werte des *Post-hoc* Tests angegeben. Rote Ziffern markieren signifikante Werte $<0,05$. (ANOVA mit Messwiederholungen gefolgt von Fischer LSD *Post-hoc* Test).

3.2.2 „tail-suspension“-Test

Im Gesamtbild wiesen die Messwerte des „tail-suspension“-Test (TST) eine sehr hohe Schwankungsbreite auf (Maximalwert zu ZT 4: 63,17 s \pm 2,73; Minimalwert zu ZT 22: 40,50 s \pm 2,54). Eine Abhängigkeit zwischen Immobilität der Tiere und dem jeweiligen Testzeitpunkt wurde für den TST klar belegt ($F_{(7, 88)}=8.38$; $p<0,001$) (Abb. 3.9). Eine Korrelation zwischen Ruhephase und Testergebnis bzw. aktiver Phase und Immobilität konnte, wie auch im Offenfeld-Test, nicht ermittelt werden. Messwerte innerhalb einer Aktivitätsphase wichen signifikant voneinander ab, obwohl maximal nur drei Stunden zwischen den einzelnen Testzeitpunkten lagen. Zum Zeitpunkt ZT 4 (in der Ruhephase) wurde der größte Immobilitätswert der Tiere ermittelt. Der Fisher LSD *Post-hoc* Vergleich (Tab.3.3.) belegte, dass sich dieser Wert signifikant von anderen Werten der Ruhephase (ZT 1 und 10), sowie allen Werten der aktiven Phase (ZT 13, 16, 19 und 22) unterschied. Versuchszeitpunkte der aktiven Phase wiesen gegenüber allen Zeitpunkten der Ruhephase geringe Immobilitätszeiten auf. Die geringste Immobilität wurde am Messzeitpunkt ZT 22 ermittelt. Dieser Messwert unterschied sich signifikant von allen Werten der Hellphase, jedoch ebenso von den Messzeitpunkten ZT 16 und 19 in der Dunkelfase. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Messwerte im TST höchst unterschiedlich in Abhängigkeit vom gewählten Tageszeitpunkt ausfielen.

Tab.3.3. *Post- hoc* Signifikanzwerte

ZT Zeit	1	4	7	10	13	16	19	22
1		0,00	0,03	0,24	0,05	0,56	0,95	0,01
4			0,20	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00
7				0,29	0,00	0,01	0,03	0,00
10					0,00	0,08	0,26	0,00
13						0,17	0,05	0,53
16							0,52	0,05
19								0,01
22								

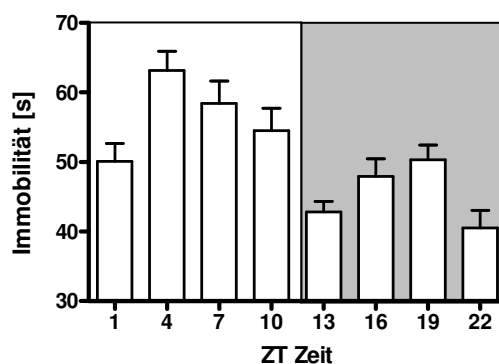


Abb. 3.9 24 Stunden Profil von C3H/HeN Mäusen im TST

Die jeweils gewählte Tageszeit für den Versuch hatte einen deutlichen Einfluss auf das Immobilitätsverhalten naiver C3H/HeN Mäuse im TST.

Das graue Rechteck hinter dem Graph symbolisiert die aktive Phase (Dunkelfase) der Tiere, das weiße Rechteck die Ruhephase (Hellphase). Die Tierzahl betrug je Testzeitpunkt $n=12$. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes. Tabellarisch sind die p Werte des *Post-hoc* Tests angegeben. Rote Ziffern markieren signifikante Werte $<0,05$. (ANOVA mit Messwiederholungen gefolgt von Fischer LSD *Post-hoc* Test).

3.2.3 „forced-swimming“-Test

Ein Zusammenhang von Tageszeit und induzierter Immobilität wurden zusätzlich im „forced-swimming“-Test (FST) untersucht (Abb. 3.10). Die Auswertung der Daten zeigte, dass die Messwerte auch in diesem Depressionstest abhängig von dem gewählten Testzeitpunkt waren ($F_{(7, 40)}=2.30$; $p<0,05$). Ein Zusammenhang zwischen Hellphase und Immobilität bzw. Dunkelphase und Testergebnis konnte nicht belegt werden. Bereits innerhalb der Hellphase schwankten die Werte zwischen $24,50 \text{ s} \pm 4,27$ (ZT 1) und $47,33 \text{ s} \pm 7,35$ (ZT 4). Der anschließende Fisher LSD *Post-hoc* Vergleich (Tab.3.4.) zeigte, dass sich der Immobilitätswert zu ZT 4 signifikant von allen übrigen Werten der Hellphase und auch denen der Dunkelphase unterschied. Während der Dunkelphase war die Variabilität der Werte im Vergleich zur Hellphase weniger groß. Die Schwankungsbreite lag hier zwischen $18,33 \text{ s} \pm 2,96$ (ZT 13) und $38,67 \text{ s} \pm 2,78$ (ZT 22). Interessanterweise wurden in diesem Versuch, anders als im TST, mit voranschreitender Dunkelphase steigende Immobilitätswerte detektiert. Doch genau wie im TST gab es auch hier zwischen den einzelnen Messwerten der Dunkelphase signifikante Unterschiede. So war diesmal die Immobilität am Ende der Dunkelphase (ZT 22) größer als zu Beginn (ZT 13). Dies ist interessant, da sowohl im TST als auch im FST Immobilität als depressionsassoziiertes Zustand interpretiert wird und diese Immobilität in beiden Tests durch zuvor verabreichte Antidepressiva vermindert wird. Auf der anderen Seite belegt eine QTL Studie sowohl überlappende, als auch unabhängige Chromosomenabschnitte, die das Verhalten der Mäuse im TST und FST bedingen (Yoshikawa *et al.*, 2002).

Tab.3.4. *Post-hoc* Signifikanzwerte

ZT Zeit	1	4	7	10	13	16	19	22
1		0,22	0,89	0,20	0,28	0,20	0,64	0,00
4			0,27	0,97	0,86	0,03	0,10	0,00
7				0,25	0,34	0,16	0,54	0,00
10					0,83	0,02	0,10	0,00
13						0,03	0,14	0,00
16							0,40	0,00
19								0,00
22								

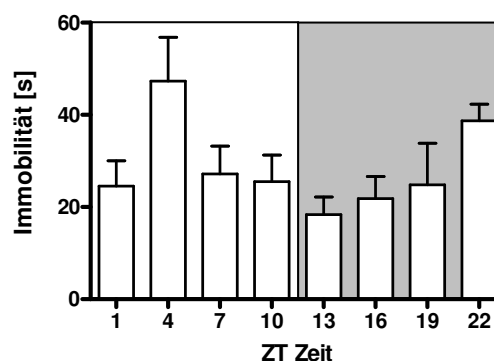


Abb. 3.10 24 Stunden Profil von C3H Mäusen im FST

Das Schwimmverhalten naiver C3H/HeN Mäuse im FST wurde von dem gewählten Tageszeitpunkt beeinflusst. Das graue Rechteck hinter dem Graph symbolisiert die aktive Phase (Dunkelphase) der Tiere, das weiße Rechteck die Ruhephase (Hellphase). Die Tierzahl betrug je Testzeitpunkt $n=12$. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes. Tabellarisch sind die *p*-Werte des *Post-hoc* Tests angegeben. Rote Ziffern markieren signifikante Werte $<0,05$. (ANOVA mit Messwiederholungen gefolgt von Fisher LSD *Post-hoc* Test).

3.2.4 Corticosteron

Zusätzlich zu den durchgeführten Verhaltensanalysen wurde auf molekularer Ebene der Corticosterongehalt der Tiere zu verschiedenen Tageszeiten bestimmt (Abb. 3.11). Blutproben wurden von ungestressten Tieren entnommen und von Mäusen, die 20 Minuten zuvor den FST absolviert hatten. Wie erwartet lag der Anteil der Corticosteroide im Serum nach dem Schwimmstress stets oberhalb von den Werten ungestresster Tiere. Der höchste Corticosteronwert von gestressten Tieren wurde in der Mitte der Ruhephase zu ZT 7 ermittelt. Besonders hohe Corticosteronwerte von ungestressten Tieren wurden zu ZT 7 und ZT 13 ermittelt. Die weitere Auswertung zu den Corticosteronwerten belegte, dass die Summe der Glucocorticoidwerte während der Lichtphase oberhalb der summierten Werte von der Dunkelphase lag. Dies traf sowohl auf ungestresste Tiere als auch auf gestresste Mäuse zu. Ferner belegten die Daten ein oszillierendes Muster für die Corticosteronwerte von ungestressten C3H/HeN Mäusen. Die oszillierende Schwankung zeigte einen ultradianen Rhythmus, der kürzer als 24 Stunden war. Es konnten aus den erhobenen Daten vier Maxima im Abstand von je sechs Stunden ermittelt werden (ZT 1, 7, 13 und 19). Diese Maxima waren ebenso für die gestressten Mäuse zu belegen, auch wenn hier die Unterschiede zwischen Maxima und Minima teilweise geringer ausfielen.

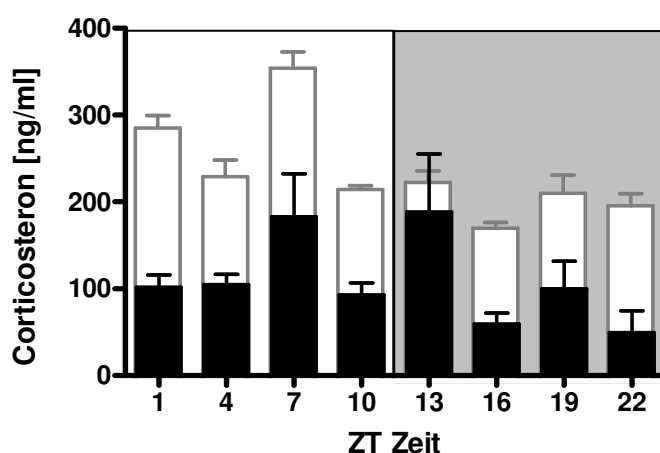


Abb. 3.11 24 Stunden Profil der Corticosteronmengen im Blut von C3H/HeN Mäusen

Der Anteil der Corticosteroide in den Serumproben schwankte in Abhängigkeit zur gewählten Tageszeit. In ungestressten, naiven C3H/HeN Mäusen schwankten die Corticosteronmengen in einem ultradianen Muster mit einer Periode von sechs Stunden (schwarze Balken). Die Corticosteronwerte von gestressten Tieren (weiße Balken) lagen zu jedem Tageszeitpunkt oberhalb der Serumwerte von ungestressten Tieren. Eine Abhängigkeit des Messwertes zur jeweiligen Tageszeit konnte auch für die gestressten Tiere belegt werden. Das graue Rechteck hinter dem Graph symbolisiert die aktive Phase (Dunkelphase) der Tiere, das weiße Rechteck die Ruhephase (Hellphase). Die Tierzahl betrug je Testzeitpunkt $n=6$. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes.

3.3 Illuminationsversuch 1

In diesem Versuch wurde ermittelt, inwieweit sich die detektierten Verhaltensauffälligkeiten von C3H/HeN Mäuse unter einer deutlich verlängerten Lichtperiode durch eine pharmakologische Therapie beeinflussen ließen. Zur Klärung dieser Frage wurden vier Mäusegruppen untersucht. Je zwei dieser Gruppen wurden unter einem LL Rhythmus gehalten, die anderen zwei unter LD Haltungsbedingungen. Ein Kollektiv, bestehend aus LL und LD Mäusen bekam ab der zweiten Woche des achtwöchigen Experimentes das Antidepressivum Imipramin über das Trinkwasser verabreicht (LL-AD und LD-AD). Dem anderen Kollektiv stand weiterhin Trinkwasser ohne Zusatz zur Verfügung (LL und LD).

Im Illuminationsversuch 1 wurde statt einer konstanten Beleuchtung ein 22:02 Stunden Licht-Dunkel Zyklus gewählt (LL Haltungsbedingung). Der circadiane Rhythmus der Tiere sollte mit Hilfe der zwei Stunden Dunkelheit an die verlängerte Lichtperiode synchronisiert werden. Diese Vorgehensweise wurde gewählt, da die Auswertung der 24 Stunden Profile belegte, dass alle Messergebnisse im Offenfeld-Test, TST und FST maßgeblich von der gewählten Tageszeit abhingen. Weiter wurde im Illuminationsversuch 1 jeder Testzeitpunkt auf die circadiane Rhythmik der Versuchstiere angepasst. Über den gesamten Versuchszeitraum wurde die Aktivität der Mäuse in ihren Heimkäfigen bestimmt. Anhand dieser Daten konnten von jedem Tier Ruhe- und Aktivitätsphasen ermittelt werden. Als Versuchszeitpunkt wurde stets die Ruhephase der Mäuse gewählt, da der Vorversuch verdeutlichte, dass eine verlängerte Lichtperiode zu einer Reduktion in der Gesamtaktivität von C3H/HeN Mäusen führte.

3.3.1 Heimkäfigaktivität

Die Auswertung der Heimkäfigaktivität von Mäusen unter einem 22:02 Stunden Licht-Dunkel Rhythmus (LL) belegte, dass zwei Stunden Dunkelheit kein ausreichender Zeitgeber waren um die Tiere zu synchronisieren. Die Mäuse zeigten einen freilau-fenden endogenen Aktivitätsrhythmus (Abb. 3.12). Als Konsequenz bedeutete dies, dass der Testzeitpunkt für die folgenden Verhaltensversuche bei Tieren unter LL Hal-tungsbedingungen stets aus ihrem aktuellen Aktivitätsprofil ermittelt werden musste. Diese Tiere konnten somit nicht zu einem festgelegten Zeitpunkt zusammen mit den Mäusen der LD Gruppe getestet werden. Der Zeitpunkt zur Versuchsdurchführung bei LL Tieren wurde entsprechend ihres subjektiven Tageszeitpunktes bestimmt und lag daher teilweise abends oder sogar mitten in der Nacht. Tiere der LD Gruppen wurden dagegen stets in ihrer Ruhephase zwischen ZT 2 und ZT 3 getestet, was der Tageszeit (MEZ) von 10:00 bzw. 11:00 Uhr entspricht.

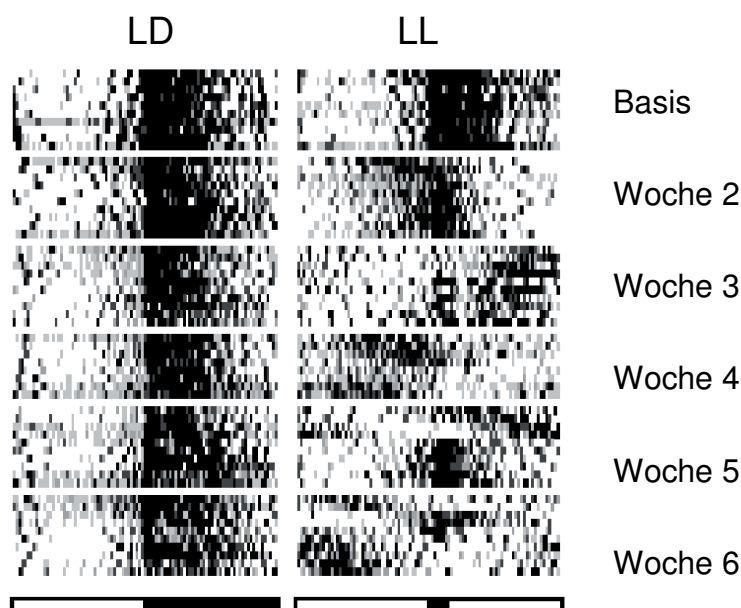


Abb. 3.12 Aktogramm der lokomotorischen Aktivität von C3H/HeN Mäusen im Heimkäfig

Die Auswertung der Aktivität von C3H Mäusen in ihren Heimkäfigen belegte eine Störung der circadianen Rhythmik durch LL Beleuchtungsbedingungen. Während Mäuse unter LD Bedingungen ihre Aktivität stets nach der Dunkelphase ausrichteten, zeigten Mäuse unter LL Bedingungen ein Aktivitätsmuster, das sich unabhängig von den zwei Stunden Dunkelheit ausbildete und täglich verschob.

Jede horizontale Reihe repräsentiert das Aktivitätsmuster einer einzelnen Maus über 24 Stunden. Aktivität wird dabei durch schwarze Markierungen repräsentiert. Gruppiert sind die Aktivitätsmuster nach der zugrunde liegenden Lichtbedingung und dem jeweiligen Messzeitpunkt. Weiße und schwarze Balken unterhalb der Graphik repräsentieren die Licht- bzw. Dunkelintervalle des Tages. Die Tierzahl betrug je Woche und Lichtbedingung n=12.

Die Daten zur Heimkäfigaktivität wurden zusätzlich genutzt, um eine Aussage zur Spontanaktivität der Tiere unter den verschiedenen Lichtbedingungen zu machen. Über 48 Stunden hinweg wurde die Aktivität der Mäuse im Heimkäfig aufgezeichnet. Daraus wurde für jedes Tier ein Aktogramme von 24 Stunden ermittelt. Die Auswertung dieser Daten zeigte, dass das Beleuchtungsintervall einen signifikanten Effekt auf die Spontanaktivität der Mäuse hatte (Abb. 3.13). LL Tiere waren im Vergleich zu Mäusen unter LD Bedingungen weniger aktiv [$F_{(1,18)} = 10,97$; $p < 0.05$]. Ferner konnte eine Interaktion der Faktoren Beleuchtung und Zeit (Beleuchtung x Zeit) in Bezug auf die Spontanaktivität der Mäuse ermittelt werden [$F_{(3,54)} = 4,63$; $p < 0.01$]. Der anschließende Fisher LSD *Post-hoc* Vergleich belegte eine reduzierte Aktivität in den Wochen vier ($p < 0.05$), fünf ($p < 0.05$), und sechs ($p < 0.05$).

Im Gegensatz dazu zeigte die Analyse der Daten von antidepressiv behandelten Mäusen, dass das veränderte Beleuchtungsintervall die Spontanaktivität von LL-AD Tieren, im Vergleich zu LD-AD Mäusen nicht reduzierte (3.14). Die Aktivität im Heimkäfig von Versuchstieren dieser beiden Gruppen war vergleichbar groß (LD-AD vs. LL-AD $p > 0,05$).

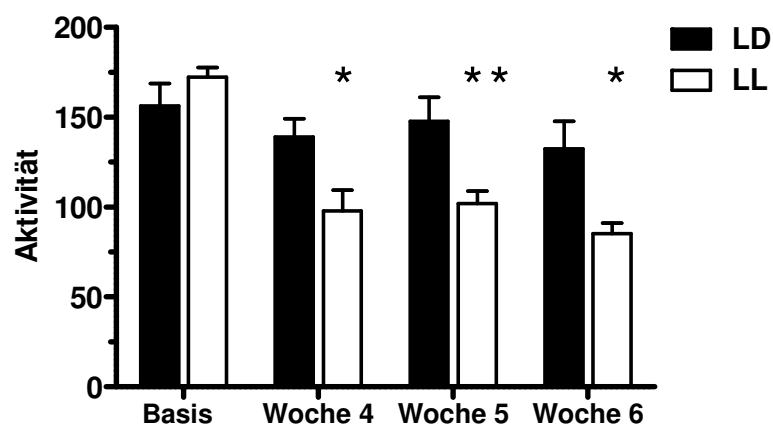


Abb. 3.13 Lokomotorische Aktivität von C3H/HeN Mäusen im Heimkäfig

Analyse der Spontanaktivität von C3H/HeN Mäusen ohne medikamentöse Therapie unter den verschiedenen Lichtregimen. LL Mäuse zeigten als Reaktion auf die veränderten Lichtbedingungen in den Wochen vier, fünf und sechs weniger Aktivität in ihrem Heimkäfig im Vergleich zu LD Mäusen.

Die Tierzahl betrug für die nicht-medikamentös behandelten Gruppen (LL und LD) jeweils $n=10$. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Zweifaktorielle ANOVA gefolgt von Fisher LSD *Post-hoc* Test).

Die Interaktion von Beleuchtung x Zeit zeigte jedoch einen signifikanten Wert [$F_{(1,54)} = 11,81$; $p < 0.001$] (Abb. 3.13 B). Der anschließende Fisher LSD *Post-hoc* Vergleich belegte allerdings, dass die Spontanaktivität der LL-AD Mäuse lediglich in Woche vier gegenüber der von LD-AD Mäusen erniedrigt war ($p < 0,01$). In den anschließenden Versuchswochen konnte kein Unterschied in der Spontanaktivität zwischen den LD-AD und LL-AD Tieren festgestellt werden. Diese Daten zeigten, dass die chronische Gabe von Imipramin die Spontanaktivität der LL Tiere im Heimkäfig modulierte und dieser Effekt eine chronische Gabe des Medikamentes von mehr als 14 Tagen erforderte.

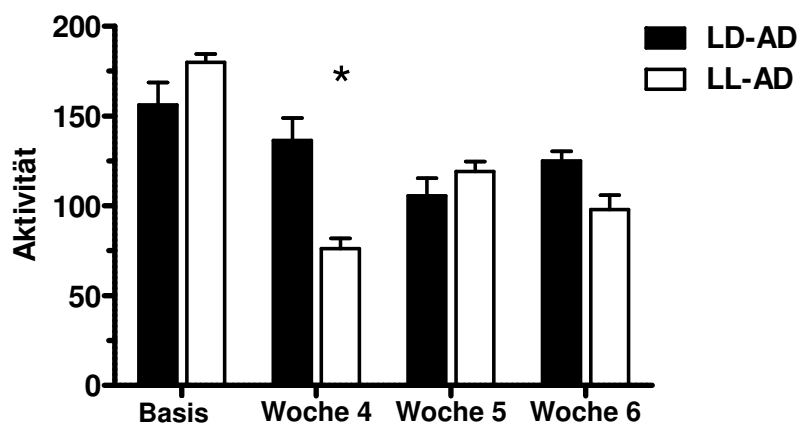


Abb. 3.14 Heimkäfigaktivität von antidepressiv behandelten C3H/HeN Mäusen

Analyse der Spontanaktivität von C3H/HeN Mäusen, die ab der zweiten Versuchswoche mit dem Antidepressivum Imipramin behandelt wurden. Diese Tiere zeigten keine Veränderung ihrer Spontanaktivität in Reaktion auf die veränderte Beleuchtungsdauer in Woche fünf und Woche sechs.

Die Tierzahl betrug für die nicht-medikamentös behandelten Gruppen (LL und LD) jeweils $n=10$, für die antidepressiv behandelten Tiere (LL-AD und LD-AD) jeweils $n=8$. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Zweifaktorielle ANOVA gefolgt von Fisher LSD *Post-hoc* Test).

3.3.2 Sucrose-Präferenz-Test

Depressionsbedingte Anhedonie wurde im Sucrose-Präferenz-Test an zwei aufeinander folgenden Tagen bestimmt (Abb. 3.15). Zu Beginn der Versuchsreihe wiesen alle Mäuse unter LD Bedingungen eine Präferenz für die süße Lösung auf und konsumierten davon mehr als vom Wasser. Die Veränderung des Beleuchtungsintervalls hatte einen signifikanten Effekt auf das Präferenzverhalten der Tiere. LL Mäuse zeigten im Vergleich zu LD Tieren einen anhedonischen Phänotyp [$F_{(1,18)} = 6,59$; $p < 0,05$]. Wie die Interaktion von Beleuchtung x Zeit aufdeckte, nahm die Präferenz der LL Mäuse signifikant über die Dauer der Versuchszeit ab. LD Mäuse zeigten dagegen während des gesamten Versuchszeitraums eine deutliche Vorliebe für die Sucroslösung [$F_{(3,54)} = 3,80$; $p < 0,05$]. Der anschließende Fisher LSD *Post-hoc* Vergleich belegte, dass Tiere unter einem 22:02 Stunden Licht-Dunkel Rhythmus im Vergleich zu Mäusen unter den 12:12 Stunden Licht-Dunkel Haltungsbedingungen eine signifikant niedrigere Präferenz für die zuckerhaltige Lösung in den Wochen fünf ($p < 0,05$) und sechs ($p < 0,05$) hatten. Bei Imipramin behandelten Tieren konnte kein anhedonischer Einfluss der Beleuchtungsdauer auf das Verhalten der Mäuse ermittelt werden [$F_{(1,16)} = 0,24$; $p > 0,05$]. Auch die Analyse der Interaktion von Beleuchtung x Zeit zeigte keinen signifikanten Effekt bei dem Vergleich von LL-AD mit LD-AD Tieren [$F_{(3,48)} = 0,13$; $p > 0,05$] (Abb. 3.14 B). Die Gabe von Imipramin verhinderte demnach die Ausprägung der lichtinduzierten Anhedonie in diesem Versuch.

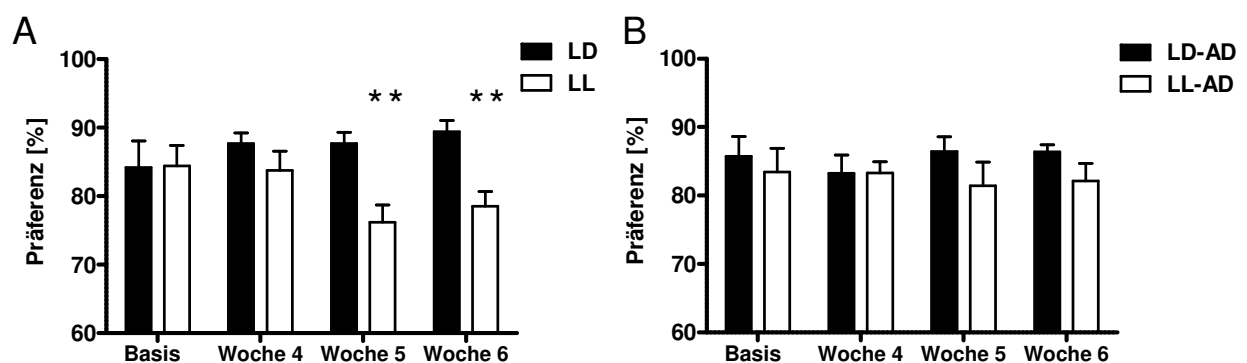


Abb. 3.15 Sucrose-Präferenz

Varianzanalyse mit Messwiederholungen der Sucrose-Präferenz von C3H/HeN Mäusen mit und ohne medikamentöse Therapie unter verschiedenen Lichtregimen.

A) Die Auswertung der nicht-medikamentös behandelten Tiere zeigte eine signifikante Abnahme der Sucrose-Präferenz in Woche fünf und sechs bei Mäusen unter LL Bedingungen im Vergleich zu den entsprechenden Tieren unter einem LD Rhythmus.

B) Unterschiede im Präferenzverhalten wurden bei Imipramin behandelten Tieren nicht detektiert (LL-AD vs. LD-AD).

Die Tierzahl betrug für die nicht-medikamentösen Gruppen (LL und LD) jeweils $n=10$, für die antidepressiv behandelten Tiere (LL-AD und LD-AD) jeweils $n=9$. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes. Weiße Balken symbolisieren LL, schwarze LD Haltungsbedingungen. ** $p < 0,01$ (Zweifaktorielle ANOVA gefolgt von Fischer LSD *Post-hoc* Test).

3.3.3 Offenfeld-Test

Hyperaktives Verhalten im Offenfeld ist für Nager im Depressionsmodel der Bulbektomie belegt (Cryan und Mombereau, 2004; Zueger *et al.*, 2005). Die Aktivität der Mäuse wurde im Offenfeld vier Wochen nach Verlängerung des Lichtzyklus untersucht. Die zurückgelegte Distanz sowie der prozentuale Anteil, den die Tiere im Zentrum der Arena verbrachten, wurden analysiert. Es wurde eine signifikante Interaktion von Beleuchtung x Zeit im Bezug auf die zurückgelegte Distanz von LL und LD Tieren ermittelt [$F_{(6,108)} = 2.50$; $p < 0,05$] (Abb. 3.16 A). LL Tiere zeigten ein hyperaktives Verhalten in der fremden Umgebung der Offenfeld-Arena, das auf den veränderten Lichtzyklus zurückgeführt wurde. Die anschließende Analyse zum Verhalten der mit Imipramin behandelten Tiere (LL-AD und LD-AD) belegte, dass ein lichtinduzierter hyperaktiver Phänotyp im Offenfeld-Test bei chronischer Gabe des Medikamentes nicht auftrat. Im Gegensatz zu den nicht-medikamentös behandelten Tieren wurde bei diesen Mäusen keine signifikante Interaktion von Beleuchtung x Zeit festgestellt (Abb. 3.16 B). Unabhängig von dem jeweiligen Lichtintervall, hielten sich alle Mäuse vergleichbar häufig im Zentrum der Arena auf. Der prozentuale Anteil, den die Tiere im Zentrum des Offenfeldes verbrachten, war gleich.

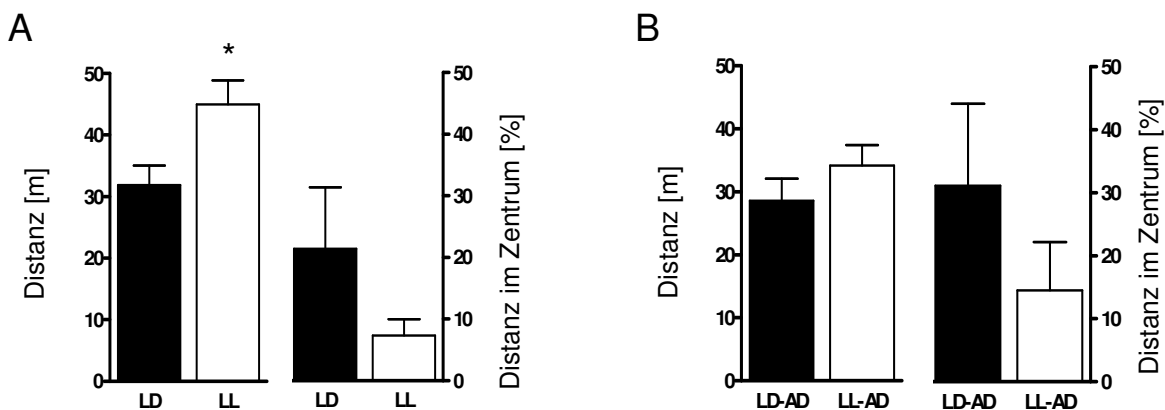


Abb. 3.16 Horizontale Aktivität im Offenfeld

Auswertung der lokomotorischen Aktivität von C3H/HeN Mäusen mit und ohne medikamentöse Behandlung 29 Tage nach Veränderung der Lichtbedingungen im Offenfeld.

A) Die Auswertung der nicht-medikamentös behandelten Tiere zeigte eine signifikant höhere lokomotorische Aktivität von LL Mäusen im Vergleich zu LD Mäusen. Tiere der LL Gruppe legten in der gleichen Versuchszeit eine signifikant größere Strecke zurück. Der prozentuale Anteil der zurückgelegten Distanz im Zentrum der Arena unterschied sich jedoch nicht in den beiden Gruppen.

B) In beiden Parametern wurden keine Unterschiede ermittelt, sofern die Mäuse ab der zweiten Versuchswoche mit dem Antidepressivum Imipramin behandelt wurden (LL-AD vs. LD-AD).

Die Tierzahl betrug für die nicht-medikamentöse behandelten Gruppen (LL und LD) jeweils $n=10$, für die antidepressiv behandelten Tiere (LL-AD und LD-AD) jeweils $n=9$. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes. Weiße Balken symbolisieren LL, schwarze LD Haltungsbedingungen. * $p < 0,05$ (Zweifaktorielle ANOVA gefolgt von Fischer LSD *Post-hoc* Test).

3.3.4 Aktivitätstest in neuem Heimkäfig

Die Konfrontation mit einem neuen Käfig („*novel cage*“) löst bei Mäusen ein lebhaftes Erkundungsverhalten aus, das mit einer veränderten Genexpression in Gehirnbereichen der Motorik- und Motivationsverarbeitung assoziiert wird. Die Auswertung dieses Tests belegte für Mäuse, die der verlängerten Lichtperiode ausgesetzt waren, einen hyperaktiven Phänotyp (Abb. 3.17 A). Die Verhaltensanalyse der Mäuse während der ersten 5 Minuten im neuen Käfig zeigte, dass LL Mäuse eine größere Distanz zurücklegten, als LD Mäuse [Distanz LL-W $36,76 \text{ cm} \pm 1,89$ vs. LD-W $31,59 \text{ cm} \pm 1,05$; * $p < 0,05$].

Das verabreichte Antidepressivum war dagegen in der Lage das hyperaktive Verhalten von LL Tieren zu modulieren. Mäuse, die mit Imipramin behandelt wurden, wiesen keine lichtinduzierte Hyperaktivität auf. Die Aktivität zwischen LL-AD Tieren und LD-AD Mäusen war vergleichbar groß [Distanz: LL-AD $28,87 \text{ cm} \pm 2,52$ vs. LD-AD $23,31 \text{ cm} \pm 2,09$ $p > 0,05$] (Abb. 3.17 B).

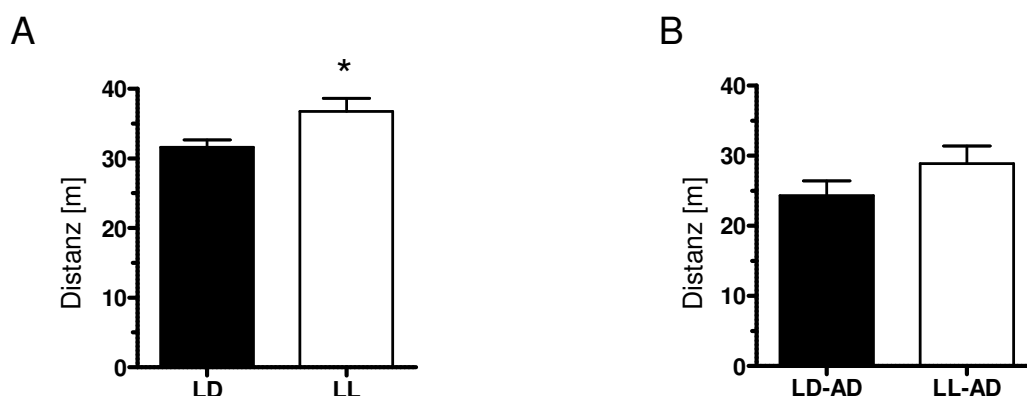


Abb. 3.17 Aktivität im neuen Heimkäfig

Auswertung zur lokomotorischen Aktivität bei Konfrontation mit einem neuen Heimkäfig 36 Tage nach Veränderung der Lichtbedingungen von C3H/HeN Mäusen mit und ohne medikamentöse Therapie.

A) Die Auswertung der nicht-medikamentös behandelten Tiere zeigte eine durch LL Haltungsbedingungen signifikant erhöhte lokomotorische Aktivität der Mäuse im Vergleich zu den entsprechenden Tieren unter dem LD Rhythmus. Mäuse der LL Gruppe legten in der gleichen Versuchszeit eine signifikant größere Strecke in der neuen Umgebung zurück.

B) Wurden die Mäuse ab der zweiten Versuchswoche mit dem Antidepressivum Imipramin behandelt, konnte kein unterschiedliches Verhalten von Tieren unter LL und LD Lichtregimen detektiert werden (LL-AD vs. LD-AD).

Die Tierzahl betrug für die nicht-medikamentösen Gruppen (LL und LD) jeweils $n=10$, für die antidepressiv behandelten Tiere (LL-AD und LD-AD) jeweils $n=9$. Abgebildet sind Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes. Weiße Balken symbolisieren LL, schwarze LD Haltungsbedingungen. * $p < 0,05$ (Varianzanalyse gefolgt von Fischer LSD *Post-hoc* Test).

3.3.5 Corticosteron

Für depressive Patienten werden oft erhöhte Werte von Glucocorticoiden im Blut dokumentiert. Daher wurde das Glucocorticoid Corticosteron bei den Mäusen aus allen Gruppen am Ende der Versuchsreihe bestimmt (Abb. 3.18). Die Blutcorticosteronwerte von LL Mäusen waren im Vergleich zu den Werten von LD Mäusen signifikant erhöht ($t_{16} = 2,19$; $p < 0,05$). Imipramin behandelte Tiere zeigten hingegen keinen Unterschied ($t_{12} = -1,46$; $p > 0,05$). Ein Vergleich der Blutwerte zwischen LL-AD und LD Mäusen zeigte ferner, dass sich die Werte auf einem vergleichbaren Niveau befanden. Durch die chronische Gabe von Imipramin wurden die erhöhten Corticosteronwerte im Serum, die bei lichtexponierten Tieren ohne pharmakologische Therapie zu detektieren waren, normalisiert.

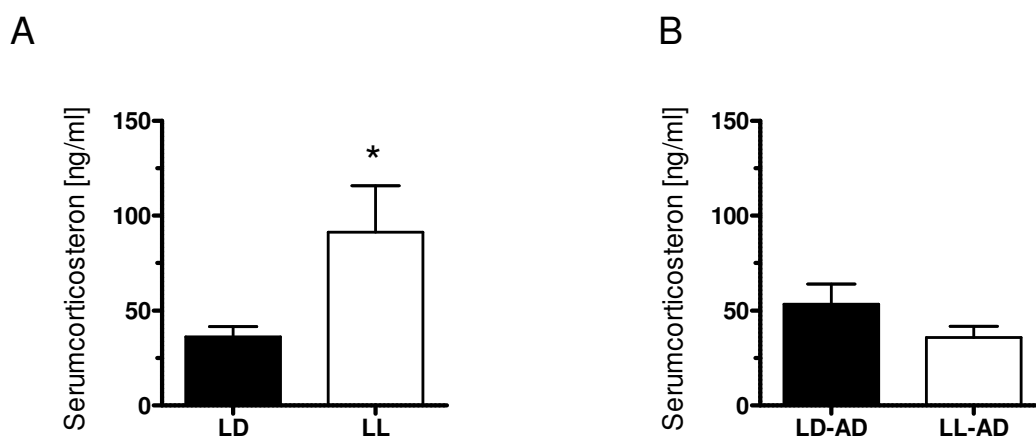


Abb. 3.18 Serumcorticosteron

Corticosteronwerte des Serums wurden aus den Halsgefäßen unmittelbar nach Dekapitation von C3H/HeN Mäusen, die eine oder keine medikamentöse Behandlung erhielten, bestimmt.

A) Nicht-medikamentös behandelte Mäuse wiesen unter LL Lichtbedingungen signifikant höhere Corticosteronwerte auf, als die entsprechenden Tieren unter dem LD Rhythmus.

B) Im Gegensatz dazu resultierten die unterschiedlichen Lichtregime bei Mäusen, die ab der zweiten Versuchswoche mit dem Antidepressivum Imipramin behandelt wurden (LL-AD vs. LD-AD) nicht in unterschiedlichen Werten der Serumcorticosterone.

Die Tierzahl betrug für die nicht-medikamentösen behandelten Gruppen (LL und LD) jeweils $n=8$, für die antidepressiv behandelten Tiere (LL-AD und LD-AD) jeweils $n=6$. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes. Weiße Balken symbolisieren LL, schwarze LD Haltungsbedingungen. * $p < 0,05$ (Student t-Test, ungepaart, zweiseitig).

3.3.6 Nebennierengewicht

Blutcorticosteronwerte unterliegen tageszeitlichen Schwankungen. Um zu untersuchen, ob die größeren Blutcorticosteronwerte bei den lichtexponierten Tieren (LL Mäusen) auf einer permanent erhöhten Ausschüttung der Glucocorticoiden basierten, wurde das paarige Gewicht der Nebennieren im Verhältnis zum Körpergewicht ermittelt. Es zeigte sich, dass die verlängerte Lichtperiode zu einer Hypertrophie der Nebennieren führte. LL Mäuse hatten signifikant schwerere Nebennieren, als LD Tiere [$t_{14} = 2,80$; $p < 0,05$] (Abb. 3.19 A). Bei Tieren, die mit dem Antidepressivum Imipramin behandelt wurden, konnte kein signifikanter Unterschied im Gewicht der Nebennieren ermittelt werden [$t_{14} = 0,45$; $p > 0,05$], (Abb. 3.19 B). Die veränderten Lichtverhältnisse hatten demnach keinen Einfluß auf das Nebennierengewicht von Mäusen unter pharmakologischer Therapie.

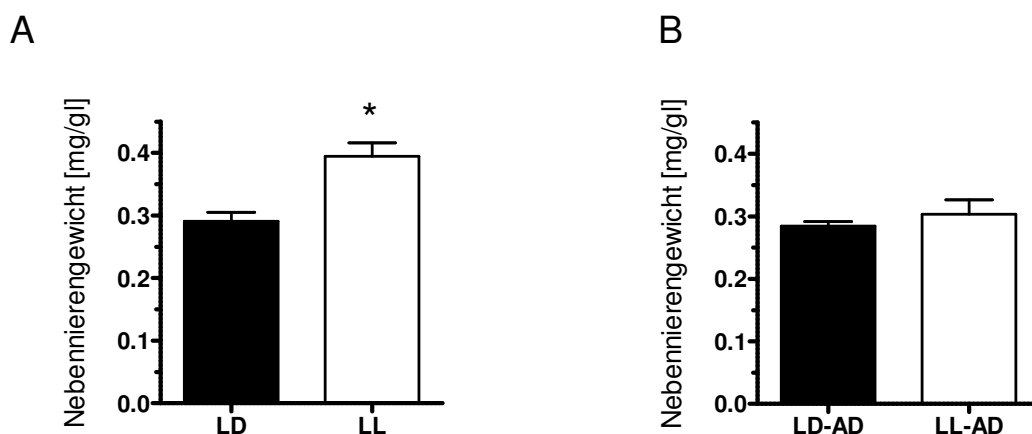


Abb. 3.19 Nebennierengewicht

Das Gewicht der Nebennieren in Relation zum Körpergewicht wurde bei C3H/HeN Mäusen mit und ohne medikamentöse Behandlung untersucht.

A) Nicht-medikamentös behandelte Mäuse unter LL Lichtbedingungen wiesen signifikant höhere Nebennierengewichte auf, als die entsprechenden Tiere unter den LD Haltungsbedingungen.

B) Im Gegensatz dazu führten die unterschiedlichen Lichtregime bei Mäusen, die ab der zweiten Versuchswoche mit dem Antidepressivum Imipramin behandelt wurden (LL-AD vs. LD-AD) nicht zu unterschiedlichen Nebennierengewichten. Diese Befunde sind in Übereinstimmung mit den zuvor bestimmten Serumcorticosteronwerten, die einen gegenüber Imipramin sensitiven Einfluss der verlängerten Lichtperiode nahe legen.

Die Tierzahl betrug für die nicht-medikamentös behandelten Gruppen (LL und LD) jeweils n=8, für die antidepressiv behandelten Tiere (LL-AD und LD-AD) jeweils n=6. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes. Weiße Balken symbolisieren LL, schwarze LD Haltungsbedingungen. * p < 0,05 (Student t-Test, ungepaart, zweiseitig).

3.3.7 Expression HHN-Achsen assoziierter Gene

Die Expression von mRNAs, die an der Regulation der Corticosteron-vermittelten Stressantwort beteiligt sind, wurde mit Hilfe der qRT-PCR untersucht. Dazu wurden die Transkriptmengen von CRH, CRHBP und CRH R1 im PVN analysiert (Abb. 3.20 A). Zunächst wurden Proben von LL und LD Mäusen verglichen. Keinerlei Unterschied wurde in der Expression der Transkripte CRH und CRHBP als Folge der unterschiedlichen Lichtbedingungen ermittelt. Jedoch zeigte sich, dass Tiere unter den LL Bedingungen signifikant mehr CRH R1 Transkripte aufwiesen, als Mäuse unter LD Haltungsbedingungen ($t_{10} = 6.65$, $p < 0.001$).

Anschließend wurden die Transkriptmengen dieser Kandidatengene in den mit Imipramin behandelten Mäusen untersucht. Zwischen den Proben aus diesen beiden Haltungsbedingungen (LL-AD vs. LD-AD) konnte kein Unterschied in der Expression von CRH, CRHBP und CRH R1 ermittelt werden. Die chronische Behandlung mit Imipramin wirkt demnach der lichtinduzierten, erhöhten Transkriptmenge des CRH Rezeptor 1 entgegen und normalisiert seine Expression (Abb. 3.20 B).

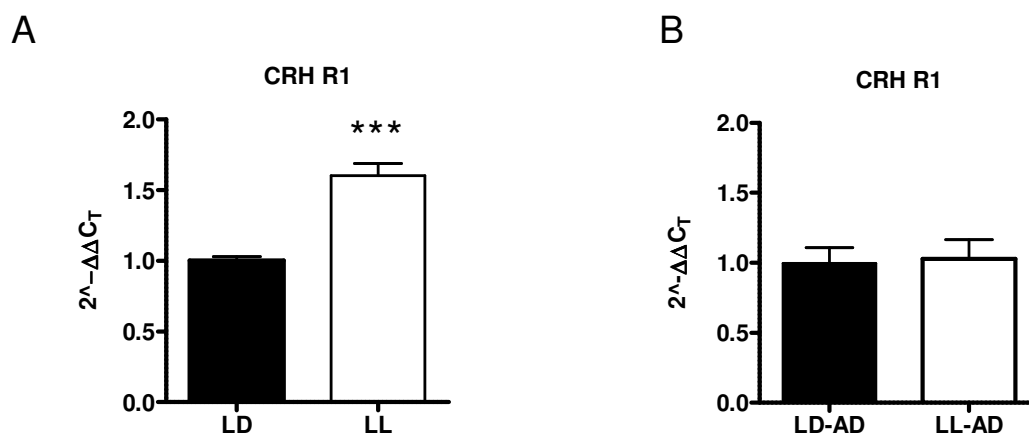


Abb. 3.20 Expression von HHN-Achsen assoziierten Genen

Quantitative Auswertung der mRNA Menge vom CRH R1 Gen im PVN von C3H/HeN Mäusen mit und ohne medikamentöse Behandlung.

A) Bei nicht-medikamentös behandelten Mäusen wurde ein signifikant erhöhter Anteil der CRH R1 mRNA unter LL Lichtbedingungen im Vergleich zu den entsprechenden Tieren unter den LD Haltungsbedingungen detektiert.

B) Bei Mäusen, die ab der zweiten Versuchswoche mit dem Antidepressivum Imipramin behandelt wurden (LL-AD vs. LD-AD), konnte kein Unterschied in der Transkriptmenge des CRH R1 Gens ermittelt werden.

Die Tierzahl betrug für alle untersuchten Gruppen (LL, LD, LL-AD und LD-AD) jeweils n=5. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes. Weiße Balken symbolisieren LL, schwarze LD Haltungsbedingungen. *** $p < 0,001$ (Mann-Whitney *U*-Test, ungepaart, zweiseitig).

3.3.8 BDNF Proteinbestimmung

Da bei Stressanpassung und depressiven Erkrankungen eine Beteiligung von BDNF vermutet wird, wurde untersucht, inwieweit die verlängerte Lichtperiode den BDNF Proteingehalt im Hippocampus beeinflusste. Es stellte sich heraus, dass die verlängerte Beleuchtungszeit zu einer deutlichen Reduktion des Proteingehalts an BDNF führte (Abb. 3.21 A). Dieser Effekt wurde nicht nur zwischen den LL und LD Mäusen detektiert [$t_{14} = -3,03$; $p < 0,05$], sondern auch beim Vergleich der Tiere festgestellt, die Imipramin bekamen [LL-AD vs. LD-AD; $t_{14} = -3,22$; $p < 0,01$]. Die verlängerte Lichtperiode resultierte in einem Rückgang des hippocampalen BDNF Gehalts, der nicht durch die Gabe von Imipramin beeinflusst wurde (Abb. 3.21 B).

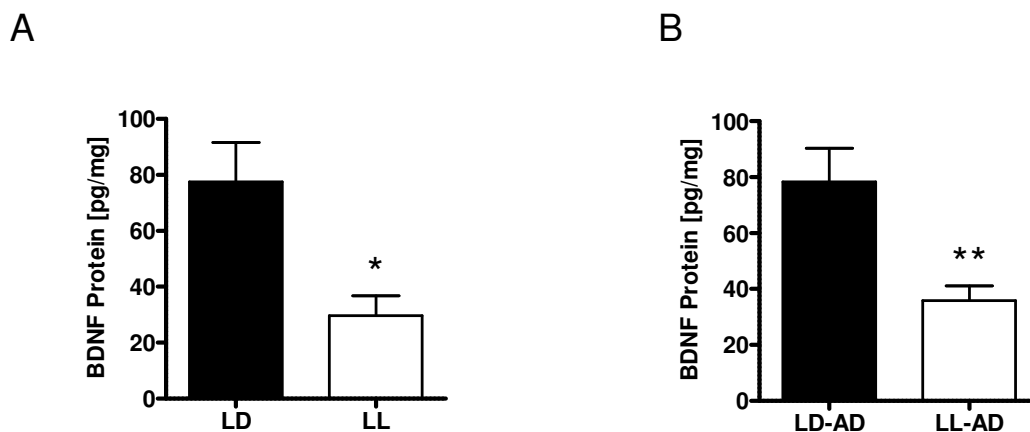


Abb. 3.21 BDNF Proteinmengen im Hippocampus

Bestimmung des hippocampalen BDNF Proteinanteils in C3H/HeN Mäusen mit und ohne medikamentöse Therapie, dargestellt in pg normalisiert zum Gesamtproteinanteil in mg.

A) Die sechs Wochen andauernden LL Haltungsbedingungen resultierten in einem signifikant erniedrigten Anteil des BDNF Proteins im Hippocampus.

B) Dieser Effekt wurde nicht durch die chronische Gabe des Antidepressivums Imipramin beeinflusst. Auch bei Imipramin behandelten Tieren unter LL Haltungsbedingungen wurde ein signifikanter Rückgang des BDNF Proteinanteils im Vergleich zu LD-AD Mäusen ermittelt.

Die Tierzahl betrug für alle untersuchten Gruppen (LL, LD, LL-AD und LD-AD) jeweils $n=5$. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes. Weiße Balken symbolisieren LL, schwarze LD Haltungsbedingungen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Student t-Test, ungepaart, zweiseitig).

3.3.9 Neurogenese

Stress und erhöhte Konzentrationen an Glucocorticoiden resultieren in einer Verminderung der Neurogenese. Aus diesem Grund sollte in dem neu entworfenen Depressionsmodell der Anteil neugebildeter Zellen im Hippocampus untersucht werden.

Zu diesem Thema wurde von unserem Institut eine Bachelor Arbeit an Frau Angelika Griep vergeben, die ich betreut, angeleitet und zu ihrem erfolgreich Abschluss begleitet habe. Im Rahmen dieser Bachelor Arbeit wurde die hippocampale Neurogenese von Tieren aus dem Illuminationsversuch 1 quantitativ und qualitativ bestimmt (Griep, 2009). Tiere, die unter einem verlängerten Lichtzyklus gehalten wurden, wiesen im Vergleich zu LD Tieren eine signifikant größere Anzahl BrdU-positiver Zellen pro mm² auf (LL 150,59 ± 9,52 vs. LD 112,03 ± 10,88). Die erhöhte Anzahl neu gebildeter hippocampaler Zellen wurde auf die verlängerte Lichtperiode zurückgeführt. Die Auswertung der mit Imipramin behandelten Tiere zeigte dagegen keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl von BrdU-positiven Zellen pro mm² (LL-AD 120,36 ± 9,41 vs. LD-AD 135,70 ± 9,10). Durch die Behandlung mit Imipramin wurde demnach der lichtinduzierte Anstieg an BrdU positiven Zellen verhindert (Abb. 3.22).

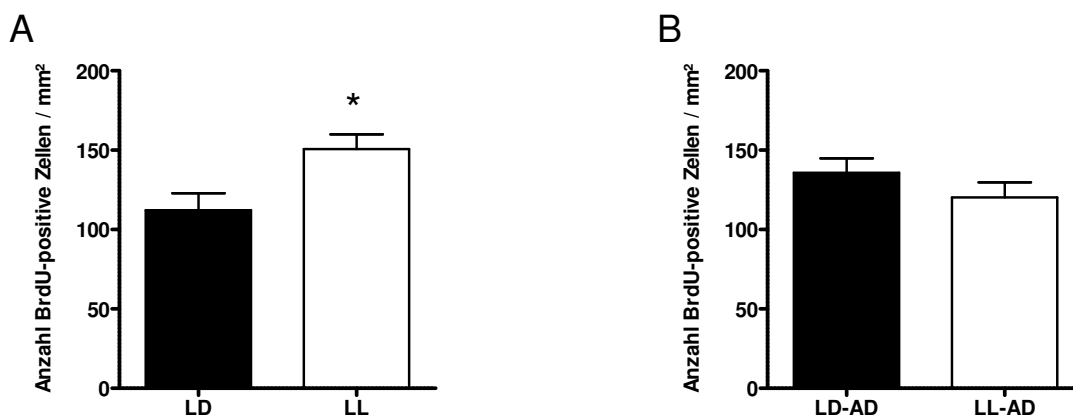


Abb. 3.22 Anzahl BrdU positiver Zellen im Hippocampus nach ABC Färbung

Quantitative Bestimmung BrdU-positiver Zellen von C3H/HeN Mäusen, mit und ohne medikamentöse Therapie, nach acht Wochen unter LL und LD Beleuchtungsintervallen.

A) Mäuse unter LL Lichtbedingungen besaßen eine signifikant höhere Anzahl BrdU-positiver Zellen im Hippocampus als Tiere unter LD Haltungsbedingungen (LL vs. LD).

B) Nach chronischer Gabe des Antidepressivums Imipramin wurde ein solcher Effekt nicht festgestellt. Die Anzahl BrdU-positiver Zellen in den Hippocampi der LL-AD und LD-AD Tiere war vergleichbar hoch.

Die Tierzahl betrug für jede Gruppe (LL, LD, LL-AD und LD-AD) n=4. Es wurden stets BrdU-positive Zellen in Schnitten von 12 Hippocampi ausgezählt. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes. Weiße Balken symbolisieren LL, schwarze LD Haltungsbedingungen.

* p < 0,05 (Student t-Test, ungepaart, zweiseitig).

Anschließend wurde der neuronale Charakter BrdU-positiver Zellen mit Hilfe einer Fluoreszenzfärbung untersucht. Auf diese Weise wurde bestimmt, wie groß die Anzahl von BrdU-positiven Nervenzellen in den untersuchten Mäusegruppen war. Von jedem Tier wurden willkürlich 50 BrdU-positive Zellen ausgewählt und diese auf den Nervenzellmarker NeuN überprüft (Abb. 3.23). Die Auswertung der Doppelmarkierung zeigte, dass der darin enthaltene Anteil an neu gebildeten Neuronen in allen Gruppen gleich war (* $p > 0,05$). Eine mögliche Verfälschung der zuvor ermittelten Daten, bedingt durch eine unterschiedliche Anzahl an unspezifischen Färbungen, wurde ausgeschlossen.

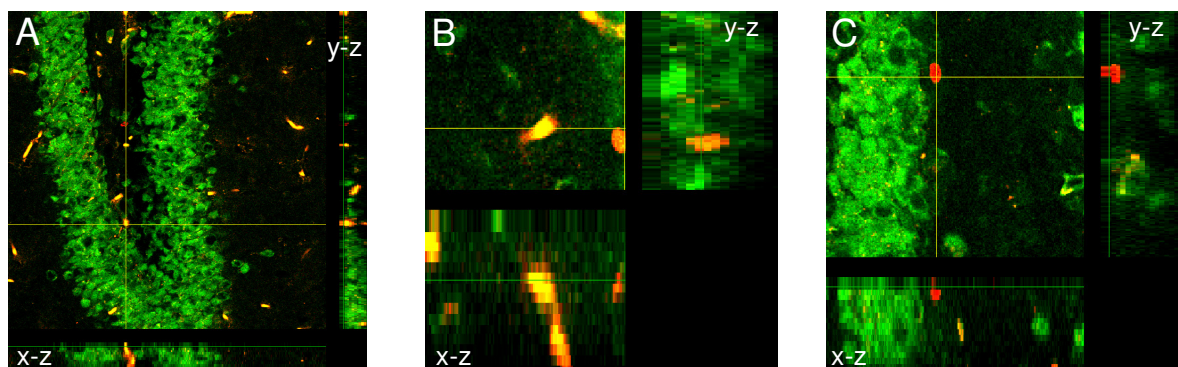


Abb. 3.23 BrdU positive Zellen im Hippocampus nach Fluoreszenzfärbung

Konfokalmikroskopische Aufnahmen der Region des *Gyrus dentatus* im Hippocampus nach Doppelfärbung (A-C). A) Übersichtsdarstellung mit 40er Vergrößerung B) Ausschnittsvergrößerung (272%) einer doppelt gefärbten Zelle (gelb) C) Ausschnittsvergrößerung (151%) einer BrdU-positiven Zelle (rot). In grün sind stets für NeuN positive Zellen (Neurone) abgebildet.

Ein Quervergleich von LD-AD Tieren mit den Wasser trinkenden LD Tieren bestätigte den neurogenesefördernden Effekt von Imipramin, da LD-AD Tiere signifikant mehr BrdU-positive Neurone pro mm^2 aufwiesen. Interessanterweise zeigte ein Quervergleich zwischen Wasser trinkenden LL Tieren und LL-AD Mäusen, ebenfalls einen Unterschied in der Neuronenanzahl pro mm^2 . LL Mäuse, die Wasser tranken, besaßen deutlich mehr BrdU-positive Neurone pro mm^2 als Tiere, die unter den gleichen Lichtbedingungen das Antidepressivum bekamen. Dies lässt vermuten, dass Imipramin einen regulativen Effekt auf die Neurogenese ausübt. Unter einem regulären 12:12 Stunden Licht-Dunkel Rhythmus förderte Imipramin das Wachstum neuer Zellen, während es unter den Bedingungen des 22:02 Stunden Licht-Dunkel Wechsels die bereits deutlich verstärkte Zellproliferation reduziert. Zusätzlich belegen die vorliegenden Daten, dass eine depressionsähnliche Symptomatik trotz einer deutlich erhöhten Neurogenese auftreten kann und nicht zwingend mit einer verminderten neuronalen Proliferation verbunden sein muss.

3.4 Illuminationsversuch 2

Die Ergebnisse aus dem ersten Illuminationsversuch zeigten, dass ein lichtinduzierter Phänotyp durch die chronische Gabe des trizyklischen Antidepressivums Imipramin abgemildert wurde. Dies lässt ein lichtabhängiges, depressionsähnliches Syndrom bei C3H LL Mäusen vermuten. In einem unabhängigen Folgeexperiment wurde deshalb die Symptomatik der lichtexponierten Mäuse unter einem 24:0 Stunden Lichtzyklus (LL) reproduziert. Zusätzlich wurde die Wirkung des Antidepressivums Fluoxetin und des Tryptophanderivats Melatonin bei Mäusen unter konstanter Beleuchtung analysiert. Im Rahmen dieser Versuchsreihe konnte der bereits zuvor ermittelte depressionsähnliche Phänotyp bei C3H/HeN Mäusen im Vergleich zu Tieren unter einem Standard 12:12 Stunden hell-dunkel Zyklus (LD) bestätigt werden und mit Hilfe eines weiteren Pharmakons (Fluoxetin) unabhängig validiert werden. Ferner deuten die Daten dieses Experimentes darauf hin, dass neben dem SSRI Fluoxetin, auch Melatonin in der Lage ist, die induzierte depressionsähnliche Symptomatik zu modulieren.

In dem Illuminationsversuch 2 wurden insgesamt drei Versuchstiergruppen unter LL und LD Haltungsbedingungen untersucht. Es handelte sich um Mäuse, die beiden Lichtbedingungen (LL und LD) ausgesetzt waren und denen entweder unbehandeltes Wasser (LL W und LD W), Fluoxetin-haltiges (LL F und LD F), oder Melatonin-haltiges (LL M und LD M) Wasser in den Trinkflaschen zur Verfügung stand.

3.4.1 Heimkäfigaktivität

Die Auswertung zur Heimkäfigaktivität belegte, dass eine konstante Beleuchtung von 24h pro Tag über 8 Wochen hinweg die Spontanaktivität der Mäuse beeinflusste. (Abb. 3.24). LL W Mäuse, die einer konstanten Beleuchtung ausgesetzt waren, bewegten sich innerhalb von 24h signifikant weniger als LD W Mäuse, die weiterhin unter einem 12:12 Licht-Dunkel Rhythmus gehalten wurden. Wie die Auswertung der Heimkäfigaktivitäts-Daten belegte, wurde dieser Effekt weder durch die Gabe des Antidepressivums Fluoxetin (LL F vs LD F; $p < 0,05$), noch durch das oral verabreichte Melatonin (LL M vs. LD M; $p < 0,05$) beeinflusst. Alle pharmakologisch behandelten Tiere zeigten unter LL Haltungsbedingungen eine signifikant reduzierte Heimkäfigaktivität im Vergleich zu den Tieren der korrespondierenden LD Gruppe. Ferner unterschied sich ihr Verhalten nicht signifikant von LL W Mäusen.

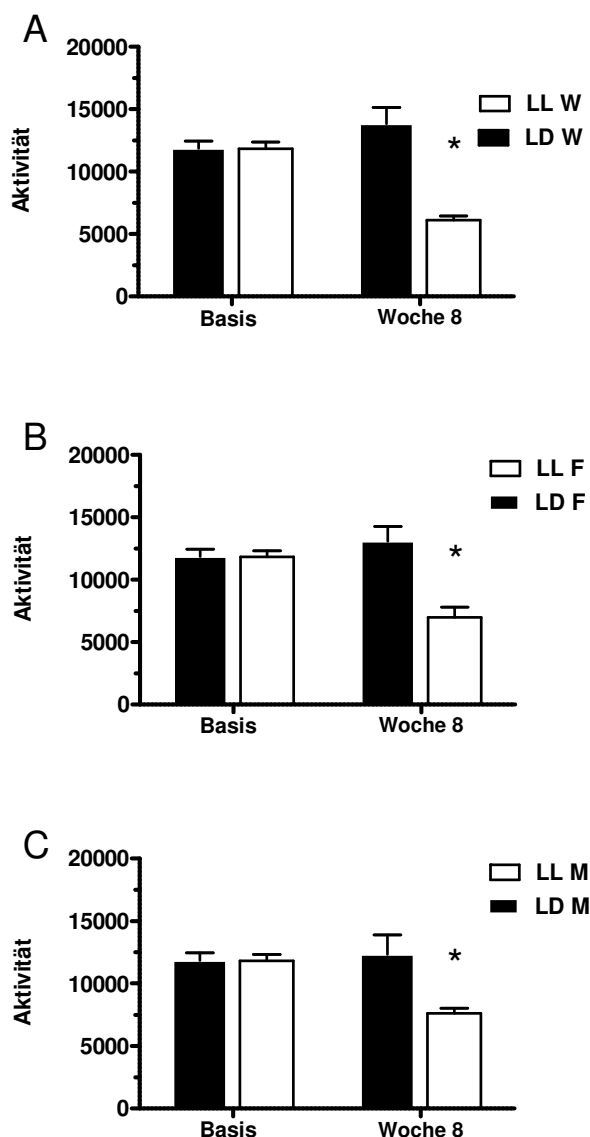


Abb. 3.24 Lokomotorische Heimkäfigaktivität

Analyse der Aktivität von C3H/HeN Mäusen mit und ohne medikamentöse Therapie unter verschiedenen Lichtregimen.

A) LL Mäuse zeigten als Reaktion auf die veränderten Lichtbedingungen in Woche 8 eine signifikant geringere Aktivität in ihrem Heimkäfig als LD Mäuse.

B) Mäuse, die ab der zweiten Versuchswoche mit dem Antidepressivum Fluoxetin behandelt wurden wiesen ein vergleichbares Resultat auf. Das verabreichte Fluoxetin hatte keinen Einfluss auf die durch die konstante Beleuchtung verringerte Aktivität der Tiere

C) Die lichtbedingte Reduktion der Heimkäfigaktivität wurde nicht von oral verabreichtem Melatonin beeinflusst. Die lichtexponierten Tiere bewegten sich signifikant weniger.

Die Tierzahl betrug für jede Lichtbedingung und Gruppe $n=10$. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes. * $p < 0,05$, (Zweifaktorielle ANOVA gefolgt von Fischer LSD *Post-hoc* Test).

3.4.2 Sucrose-Präferenz-Test

Der Sucrose-Präferenz-Test wurde acht Wochen nach Veränderung der Lichtbedingungen durchgeführt. Die Auswertung der Daten zeigte, dass Tiere der LL W Gruppe signifikant weniger die zuckerhaltige Lösung präferierten, als Mäuse der LD W Gruppe. Dieser Versuch bestätigte somit unabhängig die Anhedonie-Resultate des vorausgegangenen Illuminationsversuchs 1. Durch Veränderung der Lichtbedingungen wurde das Präferenzverhalten der Tiere für eine zuckerhaltige Lösung reduziert. Kein signifikanter Unterschied wurde allerdings innerhalb der Gruppen festgestellt, die mit Fluoxetin bzw. Melatonin behandelt wurden (LL F vs. LD F und LL M vs. LD M; $p > 0,05$) (Abb. 3.25).

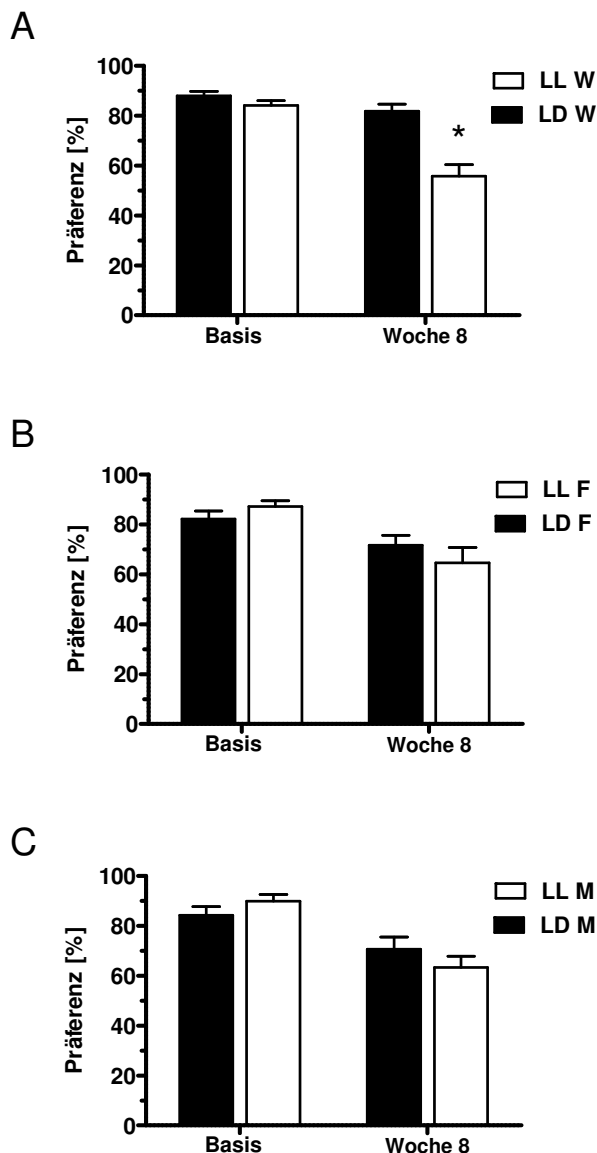


Abb. 3.25 Sucrose-Präferenz

Auswertung zur Sucrose-Präferenz von C3H/HeN Mäusen mit und ohne medikamentöse Therapie unter verschiedenen Lichtregimen.

A) Als Folge der veränderten Lichtbedingungen zeigten LL W Mäuse in der achten Woche einen anhedonischen Phänotyp in Form einer signifikant geringeren Präferenz für die Sucrose-Lösung im Vergleich zu den LD W Tieren.

B) Anhedonie konnte bei Mäusen, die ab der zweiten Versuchswoche mit dem Antidepressivum Fluoxetin behandelt wurden, in Woche 8 nicht nachgewiesen werden. Die unterschiedlichen Lichtbedingungen machten sich bei den mit Fluoxetin behandelten Tieren nicht durch eine Reduktion der Sucrose-Präferenz bemerkbar. LL F Tiere unterschieden sich nicht von LD F Tieren.

C) Keine signifikanten Unterschiede im Konsumverhalten der Tiere wurde zwischen konstanter Beleuchtung und dem 12:12 Stunden hell-dunkel Rhythmus festgestellt, sofern den Tieren Melatonin im Trinkwasser zur Verfügung stand.

Die Tierzahl betrug für jede Lichtbedingung und Gruppe $n=10$. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes. * $p < 0,05$, (Zweifaktorielle ANOVA gefolgt von Fischer LSD *Post-hoc* Test).

3.4.3 Offenfeld-Test

Die Ergebnisse der vorangegangenen Versuche zeigten, dass die größten Unterschiede im Erkundungsverhalten der Mäuse in den ersten Minuten nach Konfrontation mit der Offenfeld Arena stattfanden. Die zurückgelegte Distanz der Tiere wurde daher in diesem Test, vier Wochen nach Veränderung der Lichtbedingungen, in den ersten 5 Minuten kumulativ ermittelt (Abb. 3.26). Es stellte sich heraus, dass die konstante Beleuchtung in einem hyperaktiven Verhalten der LL W Tiere im Vergleich zu den LD W Mäusen resultierte. LL W Mäuse legten während des Versuchs eine signifikant größere Distanz zurück, als Tiere der LD W Kontrollgruppe (LL W $37,66 \text{ cm} \pm 1,99$ vs. LD W $22,64 \text{ cm} \pm 1,61$; $p < 0,001$). Der gleiche Effekt konnte bei den Mäusen beobachtet werden, denen Melatonin über das Trinkwasser verabreicht wurde (LL M $36,91 \text{ cm} \pm 2,44$ vs. LD M $25,52 \text{ cm} \pm 2,58$). Ein lichtbedingter, signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht bei den Mäusen festgestellt werden, die Fluoxetin über das Trinkwasser bekamen (LL F $30,7 \text{ cm} \pm 4,49$ vs. LD F $25,87 \text{ cm} \pm 2,21$). Das gewählte Antidepressivum normalisierte demnach die gemessene Hyperaktivität. Dieses unabhängige Experiment bestätigte die Ergebnisse des Illuminationsversuchs 1, bei dem der verlängerte Lichtzyklus ein hyperaktives Verhalten der Tiere induzierte. Zudem scheint diese Verhaltensauffälligkeit sensitiv gegenüber einer antidepressiven Medikation zu sein, da sowohl die Behandlung mit Imipramin, als auch die Behandlung mit Fluoxetin das Auftreten dieses Phänotyps verhinderte.

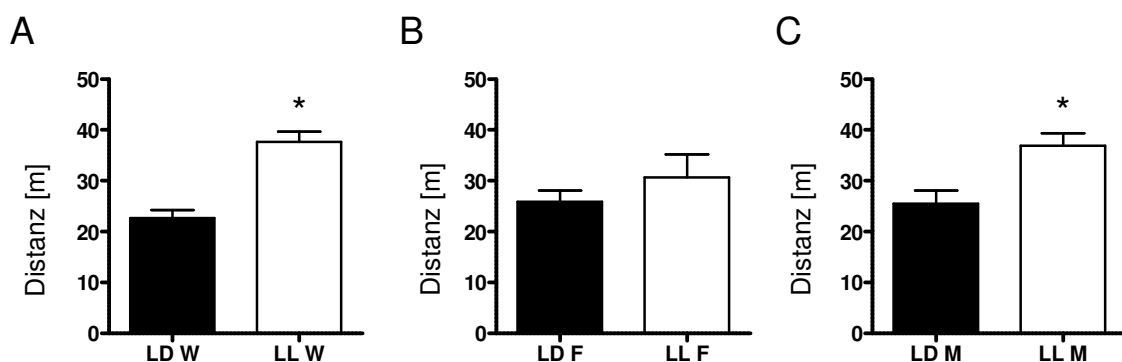


Abb. 3.26 Horizontale Aktivität im Offenfeld

Analyse der lokomotorischen Aktivität von C3H/HeN Mäusen mit und ohne medikamentöse Therapie im Offenfeld vier Wochen nach Veränderung der Lichtbedingungen. A) LL W Tiere zeigten eine signifikant erhöhte lokomotorische Aktivität im Vergleich zu LD W Mäusen. B) Keine Hyperaktivität konnte bei den Tieren unter den verschiedenen Lichtbedingungen ermittelt werden, sofern die Mäuse ab der zweiten Versuchswoche Fluoxetin bekamen. C) Melatonin war dagegen nicht in der Lage die gesteigerte Aktivität von konstant beleuchteten Tieren zu reduzieren. LL M Mäuse legten in der gleichen Versuchszeit eine signifikant größere Strecke zurück als LD M Tiere.

Die Tierzahl betrug für jede Lichtbedingung und Gruppe $n=10$. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes. * $p < 0,05$, (Zweifaktorielle ANOVA gefolgt von Fischer LSD *Post-hoc* Test).

3.4.4 Sozialer Affinitätstest

Mäuse sind eine Spezies mit einem hohen Anteil an sozialem Verhalten (Winslow und Insel, 2002; Grant und MacIntosh, 1963). Allerdings wird murines Sozialverhalten hauptsächlich in Bezug auf autistische Erkrankungen (Moy *et al.*, 2004) und nicht im Kontext depressiver Störungen analysiert. Da ein geringes Maß an Sozialität bei der Autismusforschung mit einer reduzierten Motivation für soziale Kontakte und einem verminderten Belohnungswert des sozialen Kontaktes assoziiert wird, wurde auch in der vorliegenden Arbeit das Sozialverhalten der Mäuse mit Hilfe eines sozialen Affinitätstests untersucht.

Die Auswertung der erhobenen Daten zeigte, dass Mäuse, die unter einem 12:12 Stunden Licht-Dunkel Zyklus gehalten wurden, ein gesteigertes Interesse an dem Käfig aufwiesen, wenn sich darin eine Partnermaus befand. Mäuse, die unter konstanter Beleuchtung gehalten wurden, hielten sich dagegen deutlich weniger in der Nähe des Käfigs auf, wenn dieser mit einer Partnermaus bestückt war. Die konstante Beleuchtung führte zu einer signifikanten Abnahme des sozialen Interesses an einer Partnermaus (LD W vs LL W; * $p < 0,05$). Bei Tieren, die Fluoxetin oder Melatonin mit dem Trinkwasser bekamen, konnte ein solcher Effekt nicht festgestellt werden. Die pharmakologische Behandlung der Tiere wirkte demnach der durch konstante Beleuchtung induzierten sozialen Abneigung entgegen (Abb. 3.27).

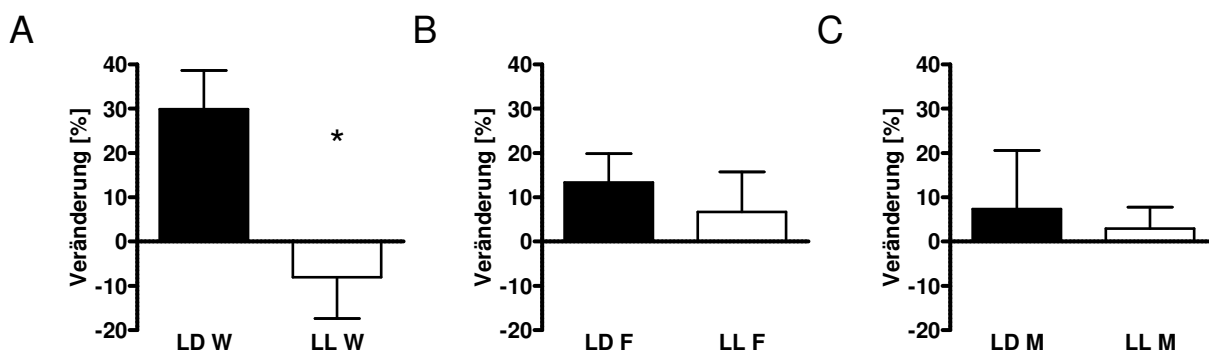


Abb. 3.27 Soziale Affinität

Analyse des sozialen Interesses bei C3H/HeN Mäusen mit und ohne Medikation unter verschiedenen Lichtbedingungen. A) Während LD W Mäuse ein deutliches Interesse an der Partnermaus zeigten, vermieden LL W Tiere die Kontaktaufnahme. B) Mäuse der Fluoxetin-Gruppe zeigten unter beiden Lichtbedingungen ein kontaktfreudiges Verhalten und Interesse an der Partnermaus. C) Bei Tieren der Melatonin-Gruppe wurde ebenfalls kein signifikanter Unterschied von LD und LL Tieren ermittelt. Die medikamentöse Therapie lichtexponierter Tiere durch Fluoxetin und Melatonin führte im Vergleich zur LL W Gruppe zu einem gesteigerten Interesse an der Partnermaus.

Dargestellt ist jeweils die prozentuale Veränderung der Zeit, die eine Testmaus in Kontakt mit einer Partnermaus verbrachte zur Situation ohne Kontaktpartner. Die Tierzahl betrug für jede Lichtbedingung und Gruppe $n=10$. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes. * $p < 0,05$, (Zweifaktorielle ANOVA gefolgt von Fischer LSD *Post-hoc* Test).

3.4.5 Körpergewicht und Futterkonsum

Bei der Durchführung des Illuminationsversuchs 1 gab es Hinweise darauf, dass Tiere unter dem verlängerten Lichtzyklus schneller an Gewicht zunahmten, als Tiere unter dem 12:12 Stunden Licht-Dunkel Zyklus. Dies gab Anlass, das genaue Körpergewicht und den Futterkonsum der Wasser trinkenden Tiere im Kontext der veränderten Lichtbedingungen im Rahmen des Illuminationsversuchs 2 zu untersuchen (Abb. 3.28). Das Gewicht der Tiere und die konsumierte Futtermenge wurden ab Beginn des Versuches zweimal wöchentlich für die nächsten 40 Tage ermittelt. Die Auswertung der Daten zum Körpergewicht zeigte, dass bereits acht Tage konstante Beleuchtung zu einem deutlichen Anstieg des Körpergewichtes führten (LL 28,54 g \pm 0,23 vs. LD 27,61 g \pm 0,20; * $p < 0,05$). Dieser Effekt blieb über die nächsten 32 Tage konstant. Die Ermittlung des Futterkonsums zeigte erstaunlicherweise, dass der Futterkonsum zwar am Messtag acht signifikant höher war, dann aber stets signifikant unter der konsumierten Futtermenge der LD Tiere lag. Tiere unter der konstanten Beleuchtung wogen mehr, nahmen jedoch eine geringere Futtermenge zu sich. Die konstante Beleuchtung führte offenbar zu einem veränderten Stoffwechsel.

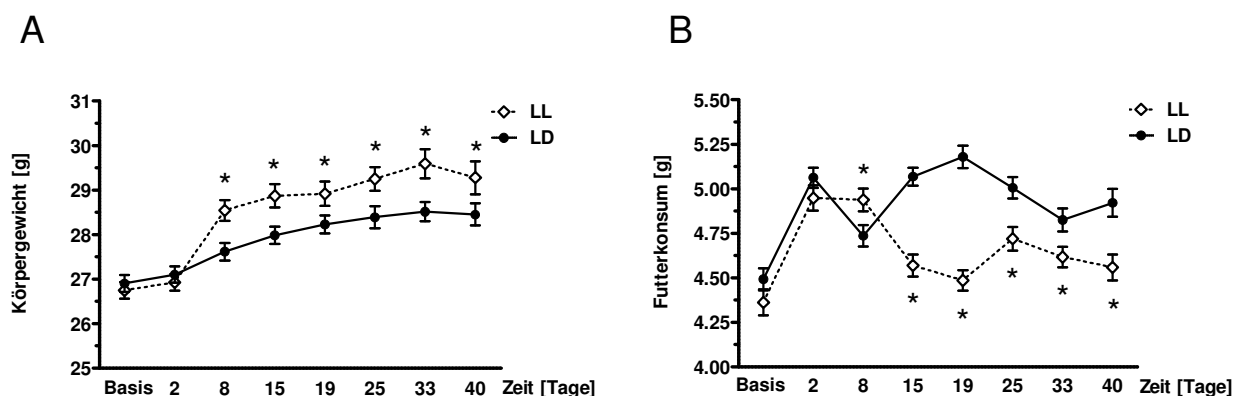


Abb. 3.28 Körpergewicht und Futterkonsum

Auswertung des Körpergewichts und Futterkonsums von Wasser trinkenden C3H/HeN Mäusen nach Veränderung der Lichtbedingungen.

A) Als Reaktion auf die konstante Beleuchtung konnte bei den Mäusen der LL Gruppe bereits nach acht Tagen ein signifikant höheres Gewicht ermittelt werden, als bei LD Tieren. Dieser Effekt war auch noch nach 40 Tagen präsent.

B) Das Konsumverhalten der lichtexponierten Tiere war gegenläufig zur Gewichtszunahme. Bereits am Tag 15 nach konstanter Beleuchtung konsumierten die Tiere der LL Gruppe signifikant weniger als die Mäuse der korrespondierenden LD Gruppe. Dieser Effekt hielt ebenfalls bis zum Tag 40 der Versuchsreihe an.

Die Tierzahl betrug für jede Gruppe (LL und LD) $n=10$. Abgebildet sind Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes. Weiße Rauten symbolisieren LL, schwarze Punkte LD Haltungsbedingungen. * $p < 0,05$ (Zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholungen gefolgt von Fischer LSD *Post-hoc* Test).

3.4.6 Microarray Analyse

Zur Identifizierung von Genen, die in einem möglichen Zusammenhang mit dem ermittelten depressionsähnlichen Phänotyp stehen, wurde die Microarray-Technologie genutzt. Mit Hilfe dieser Methode war es möglich, die relative Genexpression von mehr als 34.000 Genen in einer Probe parallel zu untersuchen. Analysiert wurde in diesem Experiment Gesamt-RNA aus dem mPFC. Es wurden Microarrays von LL F und LD F (Fig. 3.29 A) sowie von LL W und LD W (Fig. 3.29 B) angefertigt. Mit Hilfe dieses Versuches wurden 104 Gene identifiziert, die durch den Einfluss der konstanten Beleuchtung differenziell expremiert wurden ($p < 0,05$) und oberhalb des Rauschniveaus ($FC > 1,5$) lagen (LL W vs. LD W). Von diesen Genen wurden 79 Transkripte verstärkt expremiert (ca. 76%), während bei 25 (ca. 24%) Transkripten der mRNA Anteil verringert vorlag. Im Weiteren wurden die Expressionsmuster der Mäuse verglichen, die mit Fluoxetin behandelt wurden und den unterschiedlichen Lichtbedingungen ausgesetzt waren. Es zeigte sich, dass in dieser Gruppe, bei Wahl der gleichen Auswertungsbedingungen ($p < 0,05$; $FC > 1,5$), eine deutlich erhöhte Anzahl an Transkripten verändert vorlag (> 500). Der Vergleich von LL F vs. LD F belegte, dass von 512 differenziell regulierten Genen 87 Transkripte (ca. 17%) erhöht auftraten, während 425 Transkripte (ca. 83%) in einer verminderten Menge vorlagen. Von den 104 Kandidatengenen, die als differenziell reguliert zwischen LL W und LD W ermittelt wurden, waren 20 ebenfalls zwischen LD F und LL F differenziell reguliert. Von diesen Kandidaten waren acht in der gleichen Richtung verändert (Fosl2, Nr4a2, Fos, Egr2, Homer1, Sdf2l1, Cbln4, Kalrn), während 12 Transkripte entgegengesetzt reguliert wurden (Braf, Shprh, Baz1b, Atf7, Jmy, Lgals3bp, Pnn, Gng2, Cabin1, Fam120c, Csmd1, Mbp.). Fosl2, Nr4a2, Fos, Egr2 und Homer1 sind an der Regulation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren beteiligt, während Braf, Shprh und Baz1b mittels Nucleosidbindung bei der Signaltransduktion involviert sind.

Kandidatengene, die in beiden Gruppen (LL W vs. LD W und LL F vs. LD F) zu den 70 am stärksten regulierten Transkripten gehörten, sind in Abb. 3.29 abgebildet. Es zeigt sich, dass in der mit dem Antidepressivum behandelten Gruppe unter diesen Transkripten fast ausschließlich herunterregulierte Gene befanden.

Lediglich zwei Transkripte zeigten eine erhöhte Expressionsstärke. Bei den beiden herauf regulierten Transkripten handelte es sich um Homer1 und Egr2. Die Bezeichnungen aller 70 Transkripte jeder Gruppe sowie ihre differenzielle Expression sind im Anhang zu finden. Zur biologischen Validierung der Daten mittels qRT-PCR wurde die Transkriptmenge der Kandidatengene Homer1, Egr2, NR4a2, Drd1a, Copg2a und Kalrn analysiert.

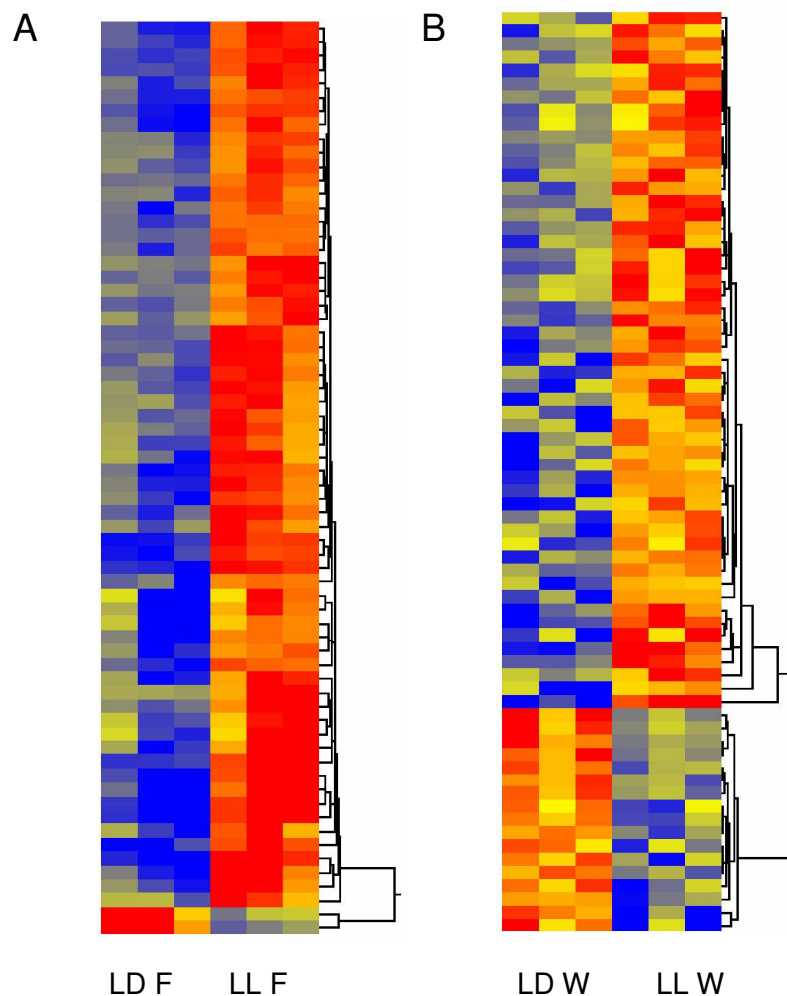


Abb. 3.29 Kluster-Analyse

Farbkodierte, hierarchische Genexpressionsprofile von C3H/HeN Mäusen nach Veränderung der Lichtbedingungen. Dargestellt sind die 70 am stärksten regulierten Gene aus dem Microarray Experiment von Tieren mit (A) und ohne antidepressive Behandlung (B).

Die Grenze der differentiellen Expression lag für A) oberhalb von 2,0 fach, für B) oberhalb der Mindestsignalintensität von 1,39fach. Das Signifikanzniveau für beide Gruppen (A und B) wurde mit $p < 0,05$ bestimmt. Die abgebildeten Kandidaten sind innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppe stammbaumartig angeordnet, um eine Unterscheidung zwischen den beiden Lichtbedingungen zu verdeutlichen. Jede Zeile entspricht einem Kandidatengen. Blau codiert ist eine erhöhte Expression, rot eine verminderte Expression dargestellt.

3.4.7 qRT-PCR

Kandidatengene, die laut Microarray Analyse eine differenzielle Expression größer als 1,4-fach besaßen und sich in ihrer Transkriptmenge signifikant voneinander unterschieden, wurden mit Hilfe der qRT-PCR in unabhängigen Proben erneut untersucht. Eine solche Analyse von Microarray-Expressionsdaten an ausgewählten Genen ist stets notwendig, um Fehlerquellen und Artefakte, die Ergebnisse von Microarray Experimenten verfälschen können, auszuschließen. Für die hier durchgeführte biologische Validierung wurden fünf mRNA Proben des mPFC von jeder Versuchsgruppe aufbereitet und analysiert (Abb. 3.30, 3.31 und 3.32). Bei den untersuchten Kandidatengenen handelte es sich um Homer1, Egr2, NR4a2, Drd1a, Copg2a und Kalrn. Die Analyse dieser stichprobenartig ausgewählten Transkripte bestätigte, die in dem Microarray Experiment ermittelte relative Expression. Der Nachweis von sechs aus sechs Kandidaten war somit erfolgreich und lässt die Annahme zu, dass die mit Hilfe des „Microarray Screening“ Verfahren erhobenen Daten in diesem Experiment valide und biologisch relevant sind.

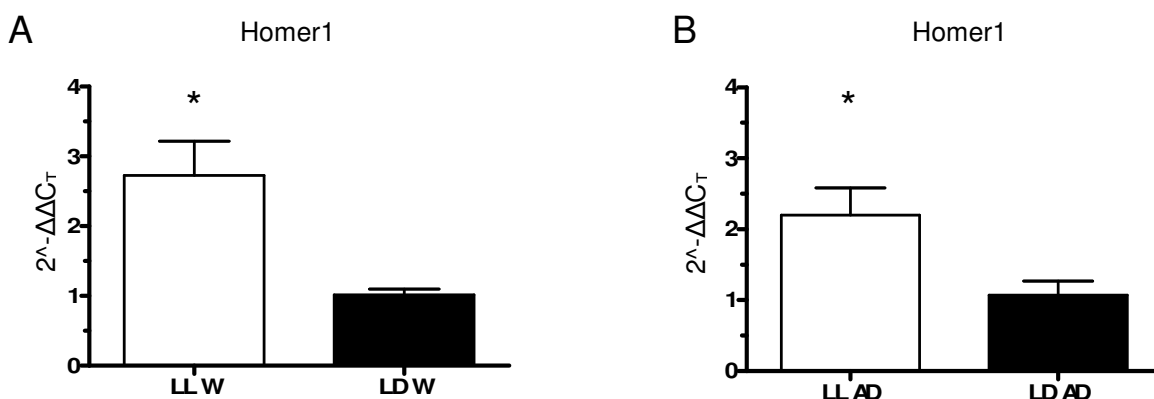


Abb. 3.30 Expressionshäufigkeit von Transkripten im mPFC

Quantitative Auswertung zum mRNA Anteil des Homer1 Gens im mPFC von C3H/HeN Mäusen mit und ohne medikamentöse Behandlung.

A) Nicht-medikamentös therapierte Mäuse unter LL Lichtbedingungen besaßen einen signifikant größeren Anteil der Homer1 mRNA als die entsprechenden C3H/HeN Mäuse unter den LD Bedingungen.

B) Mäuse, die ab der zweiten Versuchswoche mit dem Antidepressivum Fluoxetin behandelt wurden (LL AD und LD AD), zeigten keinen Unterschied in der Transkriptmenge des Homer1 Gens.

Die Tierzahl betrug für alle Gruppen $n=5$. Dies betraf sowohl nicht-medikamentös als auch medikamentös behandelte Tiere (W und AD) und jede Lichtbedingung (LL und LD). Als Referenzgen wurde beta-Aktin verwendet. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes. Weiße Balken symbolisieren LL-, schwarze LD Haltungsbedingungen. * $p < 0,05$ (Mann-Whitney U -Test, ungepaart, zweiseitig).

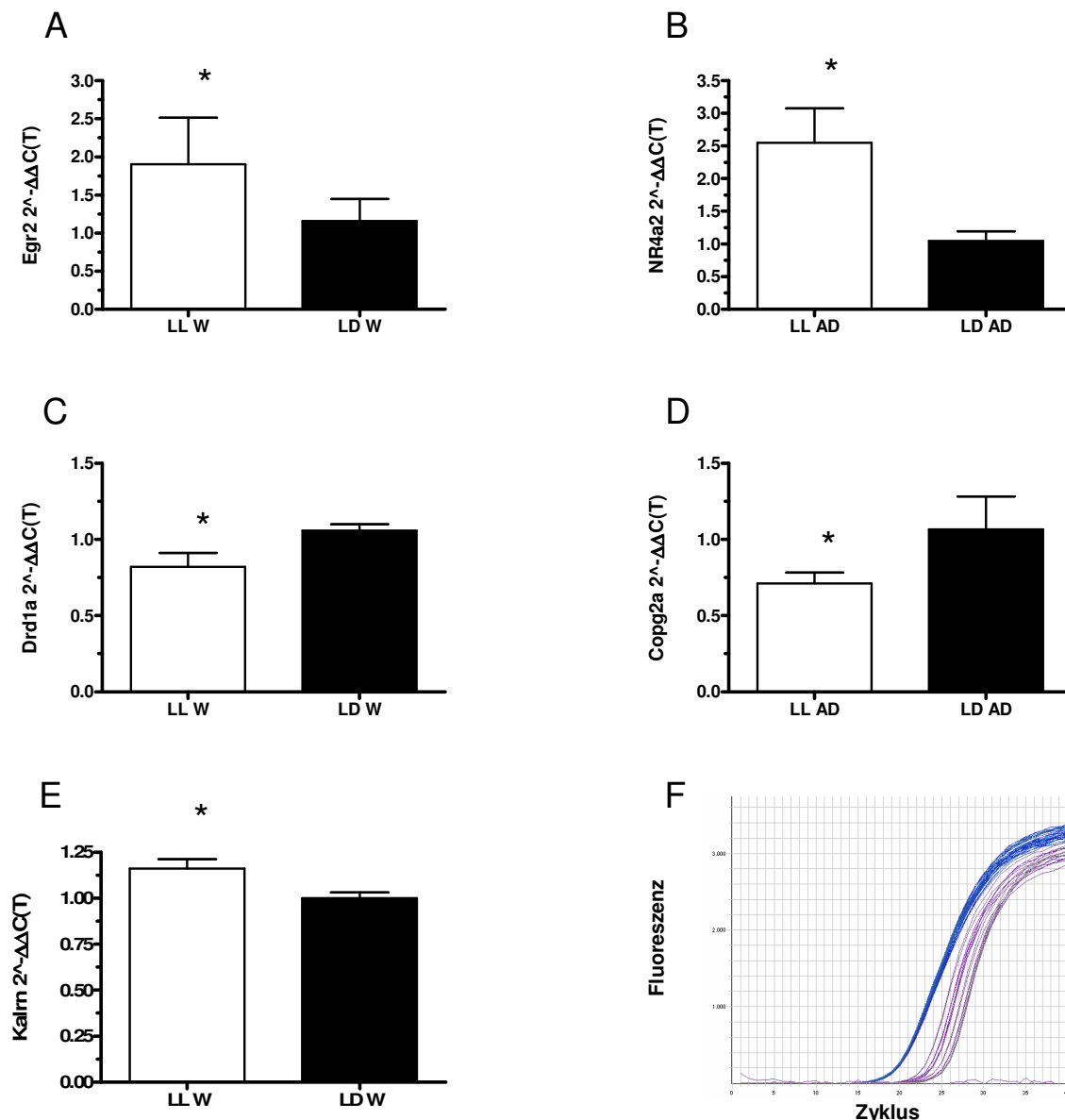


Abb. 3.31 Biologische Validierung der Microarray Daten

Quantitativer Nachweis zum mRNA Anteil von fünf weiteren Kandidatengenen des Microarray Experimentes im mPFC von C3H/HeN Mäusen ohne (A, C und E) und mit medikamentöser Behandlung (B und D). Alle Transkripte zeigten die mit Hilfe des Microarray Experimentes prognostizierte Regulation.

So waren bei LL exponierten Mäusen die Transkripte Egr2 (A) und Nr4a2 (B) heraufreguliert, während Drd1a (C) und Copg2a (D) in geringerer Expressionsstärke vorlagen. Ebenso verhielt es sich mit dem mRNA Anteil des Kalrn Gens (E), das bei Tieren der LL W Gruppe, wie erwartet, in erhöhter Anzahl vorlag.

Eine exemplarische Fluoreszenzkurve der cDNA Amplifikation von den vier Untersuchungsgruppen zeigt die Abbildung (F). Das Signal für das Referenzgen beta-Aktin ist für alle Tiere in blau abgebildet und zeigt keine verschobenen Kurvenverläufe. In violett ist die Expression für das Kandidatengen in der gleichen Probe wiedergegeben. Die violetten Kurven und damit auch die Transkriptmengen weichen deutlich voneinander ab. Alle Proben wurden in Triplikaten gemessen. Auf der x-Achse ist die Anzahl der Zyklen, auf der y-Achse ist die Fluoreszenz dargestellt.

Die Tierzahl betrug für alle Gruppen $n=5$. Dies betraf sowohl nicht-medikamentös als auch medikamentös behandelte Tiere (W und AD) und jede Lichtbedingung (LL und LD). Als Referenzgen wurde beta-Aktin verwendet. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes. Weiße Balken symbolisieren LL, schwarze LD Haltungsbedingungen. * $p < 0,05$ (Mann-Whitney U-Test, ungepaart, zweiseitig).

Illuminationsversuch 3

Sozial isolierte Ratten zeigen ein ängstliches und depressionsähnliches Verhalten mit einhergehenden Veränderungen des CRF-, GABAergen, dopaminergen und serotonergen Systems. Aus diesem Grund wurde im Illuminationsversuch 3 der Effekt sozialer Isolation auf die bereits zuvor untersuchten Parameter untersucht. Die Versuchsbedingungen wurden für dieses Experiment wie im Illuminationsversuch 1 gewählt: Mäuse wurden einerseits einem 12:12 Stunden Licht-Dunkel Rhythmus (LD) ausgesetzt, zum anderem einer chronisch verlängerten Lichtperiode (LL; 22:02 Stunden Licht-Dunkel Rhythmus). Der Unterschied zum vorangegangenen Experiment bestand darin, dass alle Mäuse in Gruppen von je sechs Tieren gehalten wurden. Die Ergebnisse dieses Experimentes belegen, dass auch vergesellschaftete Tiere zu verschiedenen Tageszeiten sowohl Auffälligkeiten im Verhalten als auch auf molekularer Ebene als Reaktion auf eine verlängerte Lichtperiode zeigen. In dem hier vorgestellten Versuchsansatz scheinen daher soziale Gefüge für die Abschwächung depressionsähnlicher Symptome eine untergeordnete Rolle zu spielen.

3.4.8 Heimkäfigaktivität

Die Heimkäfigaktivität der in Gruppen gehaltenen Tiere zeigte, dass - sofern die Mäuse einem 22:02 hell-dunkel Zeitintervall ausgesetzt waren - der endogene Rhythmus auch unter Vergesellschaftung freilaufend war. Unter diesen Bedingungen war eine Phasenverschiebung zu beobachten, deren Periodendauer oberhalb von 24 Stunden lag. Bei Tieren, die unter dem 12:12 Stunden Licht-Dunkel Intervall gehalten wurden, konnte keine Veränderung der Aktivitätsfrequenz ermittelt werden. Der endogene Rhythmus blieb an die externen Lichtverhältnisse angepasst und zeigte eine Periodendauer von 24 Stunden (Abb. 3.33 A). Außerdem war auffällig, dass in Gruppen gehaltene Tiere zwar weiterhin Phasen von Aktivität und Inaktivität zeigten, die Maxima und Minima der Aktivität jedoch von denen der Tiere unter 12:12 Stunden Licht-Dunkel Bedingungen abwichen. Die Maxima der LL-Mäuse lagen stets unterhalb der Maximawerte, die Minima dagegen oberhalb der Minimawerte der LD-Mäuse (Abb. 3.33 B).

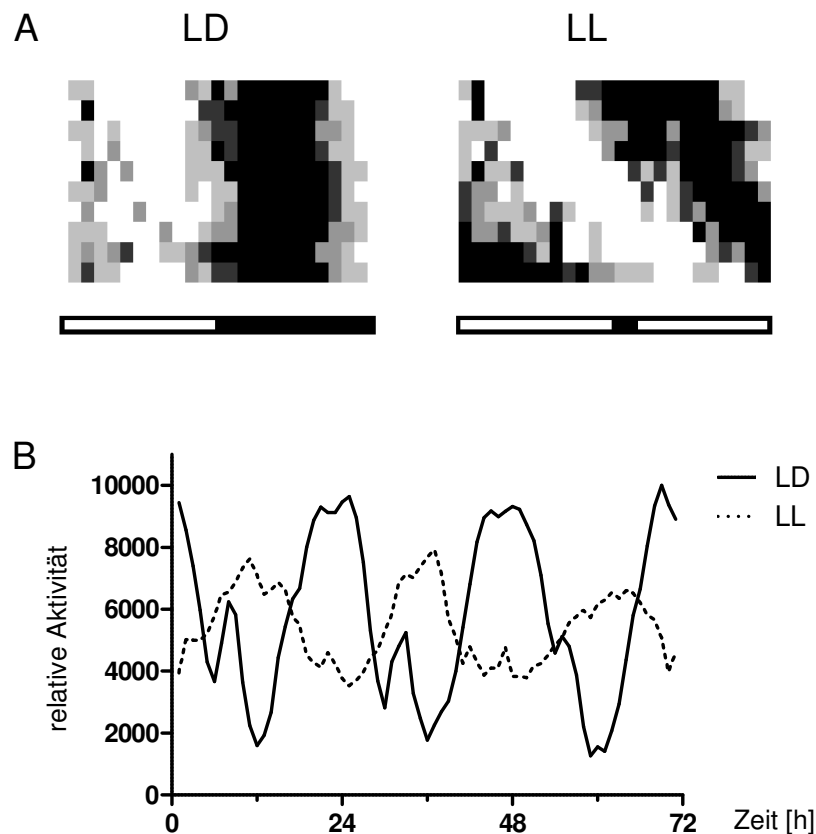


Abb. 3.33 Lokomotorische Aktivität von C3H/HeN Mäusen im Heimkäfig

Die Auswertung der Aktivität von Mäusen in ihren Heimkäfigen belegte eine Störung der circadianen Rhythmik durch LL Beleuchtungsbedingungen.

A) Wie die Aktogramme zur lokomotorischen Aktivität belegten, richteten Mäuse unter LD Bedingungen ihre Aktivität stets nach der Dunkelpphase aus. Mäuse unter LL Bedingungen zeigten jedoch ein Aktivitätsmuster, das sich unabhängig von den zwei Stunden Dunkelheit ausbildete und täglich verschob.

Jede horizontale Reihe repräsentiert den gemittelten Wert zur Aktivität von Mäusen, die in Sechsergruppen gehalten wurden, in einem Zeitintervall von 24 Stunden. Aktivität wird dabei durch schwarze Markierungen repräsentiert. Es ist der zeitliche Verlauf von 10 aufeinander folgenden Tagen abgebildet. Weiße und schwarze Balken unterhalb der Graphik repräsentieren die Licht- bzw. Dunkelphasen des Tages. Die Tierzahl betrug je Lichtbedingung $n=24$.

B) Die graphische Auswertung der Aktivitätsdaten in Form eines Kurvendiagramms belegte ferner, dass die LL Lichtbedingungen in einem gedämpften Kurvenverlauf resultierten. Die Aktivitätsmaxima von Mäusen unter LL Haltungsbedingungen waren niedriger im Vergleich zu den Maxima der Tiere unter einem LD Rhythmus. Die Minima der LL Mäuse lagen dagegen höher als die der Mäuse unter dem LD Lichtregime. Die Tierzahl betrug je Lichtbedingung $n=24$ in Gruppenhaltung zu sechs Tieren. Abgebildet sind die mittleren Aktivitätswerte pro Haltungsbedingung. Die durchgehende Linie repräsentiert die Aktivität von Tieren unter LD Bedingungen, die gestrichelte Linie die der Mäuse unter LL Beleuchtung.

3.4.9 Offenfeld-Test

Der Offenfeld-Test belegte, dass Mäuse unter einem 22:02 Stunden Licht-Dunkel Rhythmus (LL) aktiver in der Testarena waren als die Kontrollgruppe unter einem 12:12 Stunden Licht-Dunkel Zyklus (LD). Bei den analysierten Parametern handelte es sich um die während der Versuchszeit zurückgelegte Distanz (Abb.3.34 A) sowie die Anzahl an Aufrichtungen (Abb.3.34 B). Tiere unter LL Bedingungen wiesen in beiden Parametern signifikant größere Werte auf als LD Tiere. Die Auswertung dieser Daten belegte, dass das hyperaktive Phänomen unabhängig von Gruppen- und Einzelhaltung war. Zusätzlich wurden bei diesem Versuch naive Tiere zu verschiedenen Tageszeiten getestet. Die Auswertung dieser Daten zeigte, dass das hyperaktive Verhalten der lichtexponierten Tiere unabhängig von der gewählten Tageszeit auftrat.

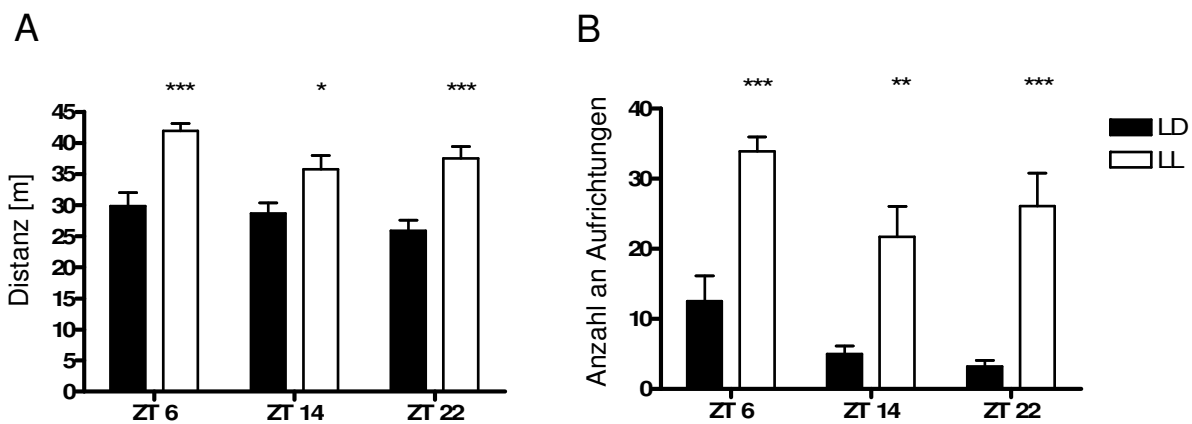


Abb. 3.34 Aktivität im Offenfeld

Auswertung der lokomotorischen Aktivität im Offenfeld 29 Tage nach Veränderung der Lichtbedingungen von C3H/HeN Mäusen in Gruppenhaltung zu je sechs Tieren zu verschiedenen Tageszeitpunkten.

A) Die Auswertung der zurückgelegten Distanz zeigte zu jedem der gewählten Tageszeitpunkte eine signifikant erhöhte Aktivität von Mäusen unter dem LL Lichtregime im Vergleich zu den entsprechenden Tieren unter LD Haltungsbedingungen.

B) Die summierte Anzahl an Aufrichtungen von C3H/HeN Mäusen unter LL Bedingungen war ebenso zu jedem der untersuchten Zeitpunkte signifikant höher als die der Mäuse unter LD Bedingungen.

Die Tierzahl betrug je Gruppe (LL und LD) zu jedem Zeitpunkt n=12. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes. Weiße Balken symbolisieren LL, schwarze LD Haltungsbedingungen. * $p < 0,05$ (zweifaktorielle ANOVA gefolgt von Fischer LSD *Post-hoc* Test)

3.4.10 „*novelty suppressed feeding*“-Test

Dieser Test dient der quantitativen Bestimmung von Angstverhalten. Er basiert auf der Annahme, dass die Motivation zur Futteraufnahme im Gegensatz zur Angst steht, die durch die fremde Umgebung ausgelöst wird. Als Maß für ein ängstliches Verhalten der Tiere wurde in der vorliegenden Arbeit die Latenzzeit gewertet, die ein hungriges Tier bis zum Fressen des Futterstückchens benötigte. Das Futterpellet wurde dabei in der Mitte der fremden Testarena präsentiert. Die Auswertung der Latenzzeiten belegte, dass kein signifikanter Unterschied im Verhalten der Mäuse durch die zwei unterschiedlichen Haltungsbedingungen hervorgerufen wurde ($\chi^2=0,04$, $p>0,05$). Tiere beider Gruppen wiesen eine vergleichbar große Angst vor der fremden Umgebung auf (Abb.3. 35). Die Analyse zu der im Anschluss an den Test konsumierten Futtermenge zeigte ebenfalls keine Unterschiede. Durch diese Befunde konnte ausgeschlossen werden, dass eine unterschiedliche Motivation das Testergebnis beeinflusst hatte.

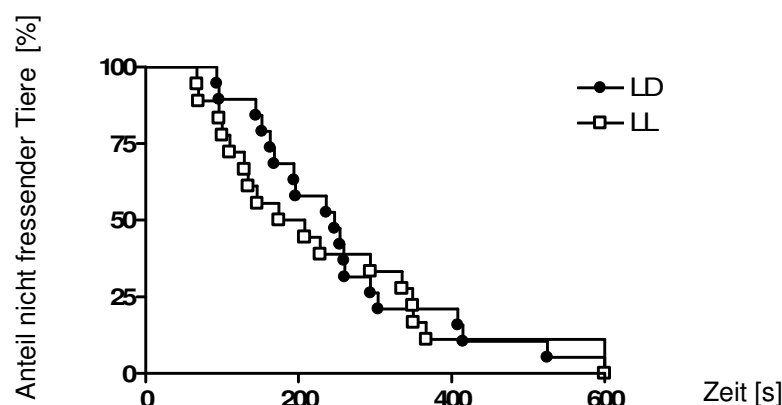


Abb. 3.35 Angstverhalten im „*Novelty suppressed feeding*“-Test

Bestimmung eines möglichen Angstphänotyps bei C3H/HeN Mäusen in Gruppenhaltung zu je sechs Tieren 36 Tage nach Veränderung der Lichtbedingungen.

Die Auswertung der Zeit bis zum Ergreifen des Futterpellets wurde nicht durch die unterschiedlichen Lichtbedingungen beeinflusst. Tiere unter LD und LL Haltungsbedingungen wiesen eine vergleichbare Latenzzeit in diesem Versuch auf. Ein möglicher Angstphänotyp bei C3H/HeN Mäusen konnte für diese Versuchsbedingungen ausgeschlossen werden.

Die Tierzahl betrug je Gruppe (LL und LD) $n=36$. Abgebildet ist die mittlere Latenzzeit bis zum Beginn der Futteraufnahme. Weiße Quadrate symbolisieren LL, schwarze Punkte LD Haltungsbedingungen. (Kurvenvergleich mittels Mantel Cox log rank Test)

3.4.11 Nebennierengewicht

Die Auswertung zu den Nebennierengewichten zeigte, dass Tiere unter LL Haltungsbedingungen signifikant schwerere Nebennieren besaßen als Kontrollmäuse unter LD Bedingungen ($t_{64} = 3,43$; $p < 0,01$). Auch unter Einbeziehung der relativen Körpergewichte änderte sich diese Aussage nicht (Abb.3.36). Das Phänomen der hypertrophierten Nebennieren war demnach unabhängig von der Vergesellschaftung der Tiere in ihren Heimkäfigen. Es trat sowohl im Illuminationsversuch 1 bei Einzelhaltung als auch beim Illuminationsversuch 3 in Gruppenhaltung auf. Die untersuchten Serumproben zeigten für C3H/HeN Mäuse unter LL Haltungsbedingungen, in Übereinstimmung mit dem Nebennierengewicht, signifikant höhere Corticosteronwerte als für Mäuse unter LD-Haltungsbedingungen (LL: $133,2 \text{ ng/ml} \pm 10,04$ vs. LD: $57,95 \text{ ng/ml} \pm 1,82$; * $p < 0,05$). Zusammen mit den hypertrophierten Nebennieren bekräftigt der Nachweis erhöhter Corticosteronwerte während der Dunkelphase (ZT 14) die Annahme einer chronischen Hyperaktivität der HHN-Achse.

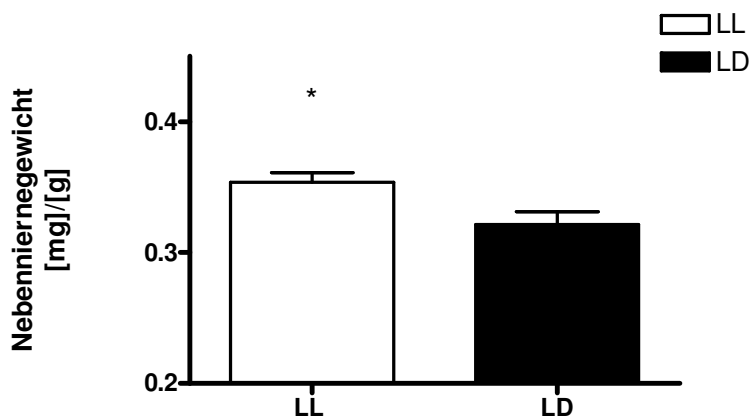


Abb. 3.36 Nebennierengewichte

Messwerte der relativen Nebennierengewichte von C3H/HeN Mäusen unter LD und LL Haltungsbedingungen. Tiere unter LL Haltungsbedingungen wiesen am Ende der Versuchsreihe signifikant schwerere Nebennieren auf.

Die Tierzahl betrug $n=32$. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes. Weiße Balken symbolisieren LL, schwarze LD Haltungsbedingungen. * $p < 0,05$ (Student t-Test, ungepaart, zweiseitig)

3.4.12 Körpergewicht

Die Auswertung des Körpergewichts zeigte, dass Tiere unter LL Bedingungen sechs Wochen nach Veränderung der Lichtbedingungen, signifikant mehr wogen als Mäuse der Kontrollgruppe unter LD Bedingungen und dies, obwohl das Ausgangsgewicht der beiden Gruppen zu Versuchsbeginn vergleichbar groß war. Diese Daten waren in Übereinstimmung mit den Gewichtsdaten des Illuminationsversuch 2, in dem ebenfalls ein höheres Gewicht bei lichtexponierten Tieren ermittelt wurde. Die Analyse der relativen Körpergewichte nach dreitägiger BrdU-Injektion zeigte, dass die Mäuse unter den LD Bedingungen durch den täglichen Injektionsstress signifikant an Gewicht verloren (gemittelte Abnahme $0,6 \text{ g} \pm 0,20$). Kein Einfluss der Applikation konnte allerdings bei Tieren unter LL Haltungsbedingungen in Bezug auf das Körpergewicht festgestellt werden (mittlere Zunahme $0,2 \text{ g} \pm 0,12$) (Abb.3. 37).

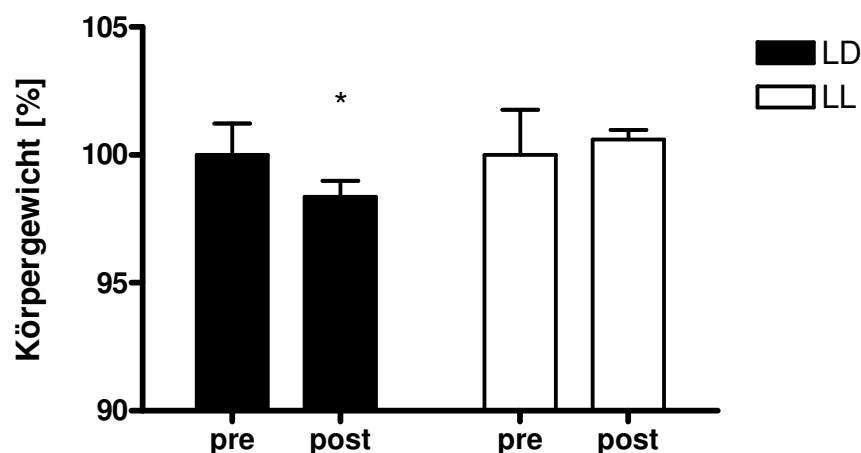


Abb. 3.37 Veränderung des relativen Körpergewichts nach BrdU-Injektion

Ermittlung des relativen Körpergewichts vor und nach dreitägiger BrdU-Injektion. C3H/HeN Mäuse unter LD Haltungsbedingungen reagierten mit einem signifikanten Verlust an relativem Körpergewicht auf den Injektionsstress, während kein signifikanter Effekt bei Tieren unter konstanter Beleuchtung (LL) festzustellen war.

Die Tierzahl betrug je Gruppe (LL und LD) $n=9$. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes vom relativen Gewicht der Tiere vor der Applikation (pre) und nach dreitägiger Injektion (post). Das mittlere Ausgangsgewicht wurde mit 100% angenommen. Weiße Balken symbolisieren LL, schwarze LD Haltungsbedingungen. * $p<0,05$ (Student t-Test, ungepaart, zweiseitig)

3.4.13 qRT-PCR des CRH R1 Gens

In dieser Versuchsreihe wurde die Expression des CRH R1 Gens auf mögliche tageszeitlich abhängige Schwankungen untersucht. Auf diese Weise sollte ausgeschlossen werden, dass die Ergebnisse des Illuminationsversuches 1 zur CRH R1 Expression durch ultradiane Schwankungen in der Expressionsstärke verfälscht wurden. Die Auswertung zu drei verschiedenen Tageszeiten belegte, dass die Transkripthäufigkeit der CRH R1 mRNA im PVN zu den gewählten Messzeitpunkten nicht variierte (Abb.3. 38). Der Einfluss eines ultradianen Effektes auf die Ergebnisse des Illuminationsversuchs 1 wurde anhand dieser Daten ausgeschlossen.

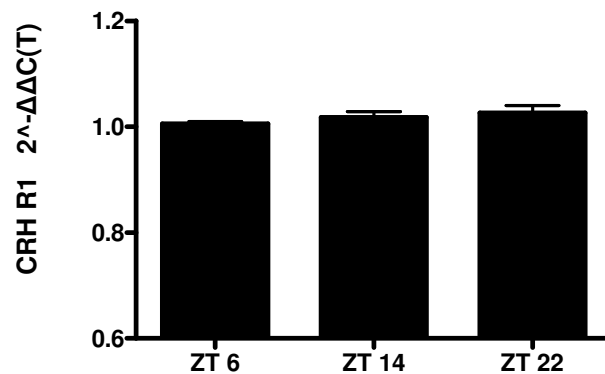


Abb. 3.38 Ultradiane CRH R1 Expression

Analyse der ultradianen Anteile der CRH R1 mRNA im PVN von C3H/HeN Mäuse unter LD Haltungsbedingungen. Eine tageszeitlich schwankende Expression des CRH R1 Gens konnte zu den gewählten Tageszeiten nicht festgestellt werden.

Die Tierzahl betrug n=5. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes. Schwarze Balken symbolisieren LD Haltungsbedingungen. (ANOVA mit Messwiederholung)

4 Diskussion

Depressive Erkrankungen weisen eine Inzidenz von weltweit ca. 340 Millionen Fällen pro Jahr auf und stellen damit den Hauptanteil affektiver Erkrankungen dar (Bartolomucci und Leopardi, 2009). Trotz intensiver Forschung sind die für Depressionskrankheiten verantwortlichen Pathomechanismen bis heute nicht vollständig aufgedeckt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neues Mausmodell zur Erforschung humaner Depressionserkrankungen entworfen, etabliert und anhand von selektiven Methoden verhaltensbiologisch sowie pharmakologisch validiert. Es konnte gezeigt werden, dass eine verlängerte Lichtperiode bei C3H/HeN Mäusen ein komplexes, depressionsähnliches Syndrom induzierte. Das Verhalten der lichtexponierten Tiere war geprägt von einer verminderten Aktivität im vertrauten Heimkäfig, aber von Hyperaktivität bei Konfrontation mit fremden Umgebungen, wie dem Offenfeld und dem „*novel cage*“. Die Tiere zeigten Anhedonie im Sucrose-Präferenz-Test und ein vermindertes Interesse an Artgenossen. In Übereinstimmung mit den Verhaltensdaten traten auf molekularer Ebene Veränderungen von Komponenten der Stressachse auf. Es wurden erhöhte Werte von Corticosteron im Serum gemessen, schwerere Nebennieren detektiert und eine veränderte Expression von stressassoziierten Genen bestimmt. Ähnliche Befunde sind bereits für etablierte Depressionsmodelle, wie dem Modell der Bulbektomie (Song und Leonard, 2005), dem Modell des sozialen Stresses (Haenisch et al., 2009 sowie Kudryavtseva und Avgustinovich, 1998) und des chronisch milden Stresses dokumentiert (Willner, 2005). Alle Verhaltensauffälligkeiten und molekularen Effekte waren nicht zu detektieren, sofern die Tiere chronisch mit dem Antidepressivum Imipramin behandelt wurden. Die chronische Behandlung mit dem Antidepressivum Fluoxetin war ebenfalls in der Lage die detektierten Veränderungen zu modulieren. Der hier vorgestellte Versuchsansatz induzierte zuverlässig ein depressionsassoziiertes Syndrom durch Verlängerung der Lichtperiode, das sensitiv gegenüber der chronischen Gabe verschiedener Antidepressiva war. Damit kann das hier vorgestellte Modell als eine vielversprechende, innovative Methode zur Untersuchung depressiver Erkrankungen angesehen werden. Im Folgenden wird auf die Bedeutung der Versuche im Bezug auf die Validität des neuen Depressionsmodells eingegangen. Die einzelnen Versuchswerte stehen dabei hinter der Kontextbetrachtung zurück.

4.1 Illuminationsversuch 1

Unter der Annahme, dass eine Veränderung in den Lichtbedingungen bei melatoninprofizienten C3H/HeN Mäusen einen depressionsähnlichen Phänotyp auslösen kann, wurde der Illuminationsversuch 1 durchgeführt.

Das erste Indiz für das Vorliegen eines depressionsähnlichen Phänotyps wurde in der vorliegenden Arbeit aus den Aktivitätsdaten der Mäuse in ihrem vertrauten Heimkäfig gewonnen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der allgemeinen lokomotorischen Aktivität bereits in der vierten Woche nach Verlängerung der Lichtperiode auftrat. Eine verminderte Aktivität im Heimkäfig ist für höhere Säugetiere der Ordnung Supraprimaten bereits in Depressionsmodellen, die auf chronisch mildem Stress (Fuchs *et al.*, 1996; Kopp *et al.*, 1999) oder sozialem Stress basieren (Huhman, 2006), dokumentiert. In diesen Studien wird die reduzierte Heimkäfigaktivität als depressionsähnlicher Phänotyp angesehen, da eine chronische Applikation der Antidepressiva Fluoxetin bzw. Clomipramin die Symptomatik aufhebt. Zudem weist Hypoaktivität in vertrauter Umgebung Parallelen zur psychomotorischen Retardierung depressiver Patienten auf. Eine reduzierte Heimkäfigaktivität, die von Störungen des Schlaf-Wach-Rhythmus und Veränderungen im monoaminergen Neurotransmittersystem begleitet wird, ist des Weiteren als Resultat von konstanter Dunkelheit für Ratten belegt (González und Aston-Jones, 2006). Die detektierten Veränderungen der lichtdeprivierten Tiere werden von den Autoren der Rattenstudie einer fehlenden circadianen Rhythmik zugesprochen und als Depressionssymptomatik der Tiere interpretiert.

In der Tat war die erste Feststellung in der vorliegenden Arbeit, dass ein 22:02 Stunden hell-dunkel Rhythmus zu einer freilaufenden endogenen Rhythmik der Tiere führte, die mit Hypoaktivität im vertrauten Heimkäfig einherging. Ein Zeitfenster von zwei Stunden Dunkelheit ist nach den vorliegenden Daten für C3H/HeN Mäuse kein ausreichender Zeitgeber, um einen synchronisierten Aktivitätszyklus / Entrainment zu gewährleisten. Welche genaue Anzahl an Dunkelstunden benötigt wird, um einen synchronisierten Tagesablauf zu generieren, wurde in diesem Experiment nicht geklärt. Dies ist jedoch eine interessante Fragestellung für weiterführende Versuche. Bei der Analyse dieses Faktors könnte untersucht werden, ab welchem hell-dunkel Zeitverhältnis depressionsähnliche Symptome nicht mehr auftreten. Ferner wäre es interessant zu ermitteln, inwiefern eine Wiederherstellung der circadianen Rhyth-

mik zur Verbesserung der Depressionssymptomatik beiträgt bzw. wie lange die depressionsassoziierten Verhaltensauffälligkeiten anhalten, sofern ein 12:12 Stunden hell-dunkel Rhythmus wieder hergestellt ist.

Als ein Indiz für das Vorliegen eines depressionsähnlichen Syndroms, das durch die Verlängerung der Lichtperiode induziert wird kann angeführt werden, dass eine reduzierte Heimkäfigaktivität nicht detektiert werden konnte, sofern die Mäuse mehrere Wochen mit dem Antidepressivum Imipramin behandelt wurden (LL-AD und LD-AD). Die Feststellung, dass der Therapieerfolg von Imipramin erst nach einer mehrwöchigen Applikation einsetzt, ist zudem in Übereinstimmung mit der Literatur. Im Modell des chronischen, milden Stresses setzt der Wirkbeginn von Imipramin verzögert nach ca. zwei Wochen ein (Gittos und Papp, 2001). Ebenso geben klinische Studien für antidepressiv wirkende Substanzen eine typische Wirklatenz von vier bis fünf Wochen an (Papp *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse sind zusätzliche Aspekte, die sowohl die Inhalts- als auch Kriteriumsvalidität des hier neu vorgestellten murinen Depressionsmodells betonen.

Im Gegensatz zu der ermittelten Hypoaktivität im vertrauten Heimkäfig reagierten lichtexponierte Tiere bei Konfrontation mit einer neuartigen Umgebung mit einem hyperaktiven Verhalten. Eine gesteigerte Aktivität war bei LL Mäusen sowohl in den ersten fünf Minuten des Offenfeld-Tests, als auch im „*novel cage*“-Test zu ermitteln. Ein generelles, motorisches Defizit der lichtexponierten C3H/HeN Mäuse, das für die zugleich auftretende Hypoaktivität im Heimkäfig verantwortlich war, lässt sich anhand dieser Befunde ausschließen. Vielmehr wird bei der hypoaktiven Symptomatik im vertrauten Heimkäfig von einem depressionsassoziierten Motivationsdefizit ausgegangen, das von Hyperaktivität in fremden Umgebungen begleitet wird. Eine hyperaktive Symptomatik, als Reaktion auf eine unbekannte Situation, ist für Nager bereits in zahlreichen, etablierten Depressionsstudien belegt. Mäuse zeigen einen hyperaktiven Phänotyp im modifizierten Lochbretttest (Schweizer *et al.*, 2009) und im Offenfeld-Test (Zueger *et al.*, 2005) nach olfaktorischer Bulbektomie sowie als Reaktion auf chronischen, milden Stress (Grønli *et al.*, 2005; Mineur *et al.*, 2006; Willner, 2005). Ebenso weisen Ratten ein hyperaktives Verhalten als Folge von sozialer Isolation (Garzón *et al.*, 1979) und von frühkindlicher Separation auf (Colorado *et al.*, 2006). Das gemessene hyperaktive Verhalten der Tiere in den fremden Testumgebungen wird daher auch in dieser Versuchsreihe als ein depressionsassoziiertes Indiz aufgefasst.

Ferner deckt sich der hier vorgestellte Befund mit Daten von Crabbe (1986) sowie Grailhe *et al.*, (1999), die für Nager einen hyperaktiven Phänotyp nach Konfrontation mit neuartigen Situationen dokumentieren. Dieses Verhalten wird von den Autoren einem gesteigerten Vigilanzzustand („arousal“) zugeschrieben. Die Hyperaktivität der LL C3H/HeN Mäuse, nach Konfrontation mit einer fremden experimentellen Umgebung, wird daher in der vorliegenden Arbeit im Speziellen als eine krankhaft erhöhte Vigilanz betrachtet. Die Annahme einer lichtinduzierten, depressionsassoziierten Vigilanzstörung wird zusätzlich gestärkt, da ein hyperaktives Verhalten von antidepressiv behandelten, lichtexponierten (LL-AD) Mäusen gegenüber LD-AD Tieren nicht detektiert werden konnte. Weder im Offenfeld-Test noch bei Konfrontation mit einem neuen Käfig, war ein signifikanter Unterschied zwischen den antidepressiv behandelten Mäusegruppen (LL-AD vs. LD-AD) zu belegen. Diese Analysen bekräftigen die Annahme, dass die gesteigerte horizontale Aktivität eine höhere Vigilanz der lichtexponierten Mäuse reflektiert, die sensitiv gegenüber der Behandlung mit Imipramin ist. Interessanterweise gehören gerade Vigilanzstörungen neben Teilnahms- und Freudlosigkeit sowie Schlafstörungen zu den Symptomen posttraumatischer Belastungsstörungen, die eine hohe Komorbidität mit depressiven Syndromen und Suizidalität besitzen.

Zudem weist die Hyperaktivität von C3H/HeN Mäusen im Offenfeld-Test, neben der Übereinstimmung zu gut etablierten Depressionsmodellen, Parallelen zu der humanpathogenen Situation auf. Für den speziellen Krankheitstyp der psychomotorisch agitierten Depression gilt motorische Unruhe (Hyperaktivität), gepaart mit einem gesteigerten Bewegungsdrang, als ein typisches Diagnosekriterium. Dieser Befund stärkt zusätzlich die augenscheinliche Validität des hier vorgestellten Depressionsmodells. Ferner zeigen die Ergebnisse, dass sowohl die Hypoaktivität der Mäuse im vertrauten Heimkäfig, als auch die Hyperaktivität in unbekannten Situationen als eine depressionsähnliche Symptomatik aufgefasst werden kann, die sensitiv gegenüber einer antidepressiven Behandlung ist. Diese Ergebnisse stellen damit die prädikative Validität des neuen Depressionsmodells heraus.

Ein möglicher Einfluss von Angst auf das Aktivitätsverhalten der Tiere in einer fremden Umgebung, wurde durch die Auswertung des prozentualen Aufenthalts der Mäuse im Zentrum der Offenfeld-Arena bewertet. Ein vermehrter Aufenthalt in den erleuchteten, zentralen und offenen Bereichen der Testumgebung wird als Indikator für eine geringe Ängstlichkeit betrachtet, während Bewegungen der Tiere entlang der

Wände ein ängstliches Verhalten reflektieren (Belzung, 1999). Die Analyse der Offenfeld-Daten belegte, dass Tiere unter LL und LD Bedingungen gleich viel Zeit im Zentrum der Arena verachten. Die gesteigerte horizontale Aktivität der Mäuse unter LL Haltungsbedingungen, lässt sich daher nicht auf ein geringeres Angstverhalten der Tiere in der fremden Umgebung zurückführen. Ein anxiolytisches Verhalten, durch die veränderten Lichtbedingungen, ist somit auszuschließen. Da auch Imipramin behandelte Mäuse unter beiden Lichtbedingungen (LL-AD vs. LD-AD) gleich viel Zeit im Zentrum der Arena verbrachten, kann zudem ausgeschlossen werden, dass das verabreichte Antidepressivum durch einen anxiolytischen Effekt das Verhalten der Mäuse im Offenfeld beeinflusste.

Unabhängig von der lokomotorischen Aktivität wurde in dieser Versuchsreihe die Präferenz der Mäuse gegenüber einer 8%igen Sucrose-Lösung als Depressionsmarker untersucht. Die hoch konzentrierte Zuckerlösung war notwendig, da C3H/HeN Mäuse nur in geringem Maß auf niedrige Zuckerkonzentrationen ansprechen. Ursächlich für dieses Verhalten sind Sequenzvariationen im T1R3 Gen der Mäuse (Bachmanov *et al.*, 2002, Glendinning *et al.*, 2005). Mausstämme mit einer geringen Sensitivität gegenüber Süßem, wie C3H/HeN Mäuse, zeichnen sich durch den Besitz des „nontaster“ Allels (NT-Allel) aus. Bei Mauslinien mit einer hohen Sensitivität gegenüber Süßem liegt dagegen das „taster“ Allel (T-Allel) vor. Zu diesen Stämmen zählen C57BL/6J Mäuse. Diese Befunde spiegeln sich auch in den Ergebnissen des Vorversuchs wieder. Bereits zu Beginn des Vorversuchs tranken C57BL/6J „taster“-Mäuse vermehrt die 1%ige Saccharinlösung, während C3H/HeN „nontaster“-Mäuse keine Vorliebe für die schwach konzentrierte Saccharinlösung zeigten. Die Präferenz von C57BL/6J „taster“-Mäuse lag oberhalb von 80%. Dies lässt auf eine geschmackliche Erkennung und Bevorzugung der süßen Lösung gegenüber Wasser schließen. Im Gegensatz dazu lag die Präferenz der C3H/HeN „nontaster“-Mäuse unter LD Haltungsbedingungen, zu Versuchsbeginn, unterhalb von 60%. Eine Präferenz von 50% wird allerdings bereits erreicht, sofern beide Flaschen gleich stark frequentiert werden und keine der beiden bevorzugt wird. Bei den gemessenen Präferenzwerten um 60% von C3H/HeN Mäusen im Vorversuch, kann daher nicht von einer deutlichen Bevorzugung der Saccharinlösung ausgegangen werden. Vielmehr deuten diese Daten darauf hin, dass die Konzentration der Saccharinlösung unterhalb der gustativen Detektionsschwelle der „nontaster“-Mäuse lag und die Lösung von den C3H/HeN Mäusen nicht als süß detektiert wurde. Diese Annahme deckt sich mit

den Ergebnissen der Studie von Capeless und Whitney (1995), die eine Präferenz bei C3H Mäusen nur gegenüber hoch konzentrierten Saccharinlösungen (bis 10mM/l) belegen.

Die Auswertung der Sucrose-Präferenz-Daten vom Illuminationsversuch 1 belegt zu Beginn der Versuchsreihe, Präferenzwerte von über 80% für die hoch konzentrierte Zuckerlösung. Die 8%ige, zuckerhaltige Lösung wurde demnach von allen C3H/HeN Mäusen gustatorisch detektiert und stellte einen hedonischen Reiz für die „nontaster“-Mäuse dar. Nach Veränderung des circadianen Rhythmus wurde bei lichtexponierten Tieren eine Abnahme dieser Präferenz festgestellt. Dieses depressionsassoziierte Symptom der Anhedonie war jedoch nicht bei pharmakologisch behandelten Tieren zu verzeichnen. Imipramin war demnach in der Lage das depressionsähnliche Verhalten der Mäuse zu modulieren. Im Modell des chronischen, milden Stresses gilt Anhedonie als Hauptkriterium für das Vorliegen einer Depressionssymptomatik, die dem Modell einen besonders hohen Grad augenscheinlicher Validität verleiht (Willner et al., 1992). Allerdings wird dort ein Rückgang in der Präferenz für süße Lösungen häufig erst nach Futter- und Wasserentzug beobachtet. Dieser wird von Kritikern als zusätzlicher Stressfaktor gewertet. In der vorliegenden Arbeit trat Anhedonie ohne vorherigen Entzug von Futter und Wasser auf und wurde, wie im Modell des chronischen, milden Stresses (Monleon *et al.*, 1994; Stein *et al.*, 2009) oder Modellen von sozialem Stress (Rygula *et al.*, 2005; von Frijtag *et al.*, 2002), durch die chronische Gabe von Imipramin revertiert. Die ermittelte Anhedonie im Illuminationsversuch 1 kann somit als ein weiteres Indiz für das Vorliegen eines depressiven Phänotyps betrachtet werden und stärkt die Validität des hier vorgestellten, innovativen murinen Modellansatzes.

Neben dem Auftreten von Anhedonie werden humane Depressionserkrankungen auf molekularer Ebene stark mit einer Dysregulation der HHN-Achse assoziiert (Nestler 2002; van den Eede 2004, Müller und Holsoer 2006). Bei depressiven Patienten ist neben einer Überproduktion von CRH auch Hypercortisolismus und eine gestörte Rückkopplungsreaktion auf das Glucocorticoidsignal belegt (Touma *et al.*, 2008). Erhöhte und gegenüber trizyklischen Medikamenten sensitive Corticosteronwerte sind für Mäuse (Detanico *et al.*, 2009), Ratten (Vitale *et al.*, 2009) und Spitzhörnchen (Fuchs *et al.*, 1996) im Depressionsmodell des chronischen, milden Stresses nachgewiesen. Passend zu einem gesteigerten Corticosteronniveau sind bei Ratten (Rygula *et al.*, 2005) und nicht-humanen Primaten (Shively and Kaplan, 1984)

Werte erhöhter Nebennierenaktivität nach sozialem Stress belegt. Zudem kann bei Ratten und Mäusen durch intra-cerebro-ventriculare oder auch seitenspezifische Injektion des Stressachsenhormons CRH ein gesteigerter, physiologischer Erregungszustand (Vigilanz) ausgelöst werden (Weiss *et al.*, 1986; Buwalda *et al.*, 1997; Kagamiishi *et al.*, 2003).

In der vorliegenden Studie wurden daher regulative Parameter der HHN-Achse der Versuchstiere untersucht. Lichtexponierte Mäuse besaßen höhere Corticosteronwerte im Serum, als Tiere unter dem 12:12 Stunden hell-dunkel Zyklus. Bei antidepressiv behandelten Tieren konnten dagegen keine erhöhten Corticosteronwerte ermittelt werden. In Übereinstimmung mit diesen Befunden wiesen Mäuse unter LL Bedingungen im Vergleich zu Mäusen unter LD Bedingungen ein erhöhtes relatives Nebennierengewicht und eine gesteigerte Expression des CRH Rezeptor 1 im PVN auf. Weder erhöhte Corticosteronwerte im Blut, noch ein erhöhtes relatives Nebennierengewicht, war bei Imipramin behandelten Tieren festzustellen. Als Parallele zu diesen Resultaten sind erhöhte Werte der CRH Rezeptor 1 mRNA im PVN von Ratten in verschiedenen Stressmodellen als Depressionssymptom (Luo *et al.*, 1994; Makino *et al.*, 1995, 2002; Anisman *et al.*, 2007) und bei depressiven Patienten (Wang *et al.*, 2008) dokumentiert. Die Veränderung der Lichtbedingungen führt demnach zu einer Fehlsteuerung der HHN-Achse, die sensitiv gegenüber der Behandlung mit Imipramin ist. Speziell die fehlgesteuerte Expression des CRH Rezeptor 1 bei Mäusen unter LL Bedingungen wird als ein beeinträchtigtes Rückkopplungssignal interpretiert, das sensitiv auf das Antidepressivum reagiert. In Übereinstimmung mit dieser Annahme untersuchen klinische Studien der letzten Zeit die therapeutischen Effekte von humanen CRH Rezeptor 1 Antagonisten im Zusammenhang mit Depressionserkrankungen (Holsboer and Ising, 2008). Einer der untersuchten Antagonisten (NBI-30775/R121919) ist dabei in seiner Wirksamkeit vergleichbar gut wie das Antidepressivum Paroxetin. Auch die zweite Substanz (NBI-34041) ist in der Lage einen stressinduzierten Anstieg von Corticosteron zu reduzieren. Da diese Resultate das mögliche Potential von CRH Rezeptor 1 Antagonisten für die Behandlung depressiver Erkrankungen aufweisen, scheint eine vertiefende Analyse zur Rolle des CRH Rezeptor 1, in dem hier vorgestellten Modell der lichtinduzierten Depression, vielversprechend zu sein.

Neben den Parametern einer fehlgesteuerten HHN-Achse gelten stressinduzierte Veränderungen in der Expression neurotrophischer Faktoren als Ursache depressiver Erkrankungen. Insbesondere das Neurotrophin BDNF steht im Fokus der Forschung und wird mit einer veränderten Zytoarchitektur im Hippocampus assoziiert (Grønli *et al.*, 2006; Nair *et al.*, 2006). Gestützt wird diese Theorie von Analysen zu postmortalem Gewebe von depressiven Selbstmördern, die eine reduzierte BDNF Expression im Hippocampus belegen (Pandey *et al.*, 2008). Analog zu diesen Befunden zeigen verschiedene tierexperimentelle Untersuchungen, dass diverse Stressoren wie Immobilisationsstress, chronisch milder Stress, Schwimmstress, Fußschocks und frühkindliche soziale Trennung zu einer Reduktion im Anteil der cerebralen BDNF mRNA führen (Kozisek *et al.*, 2008). Diese Gründe gaben Anlass in der vorliegenden Arbeit den Anteil des BDNF Proteins im Hippocampus zu untersuchen. Die Auswertung der Daten zeigte, dass die Verlängerung des 12:12 Stunden Licht-Dunkel Rhythmus, zu einem 22:02 Intervall, in einem verminderten Anteil des BDNF Proteins im Hippocampus resultierte. Die chronische Gabe des Antidepressivums Imipramin beeinflusste diesen Parameter jedoch nicht. Obwohl die lichtexponierten, antidepressiv behandelten Tiere kein depressives Verhalten zeigten, waren erniedrigte BDNF Werte waren auch in dieser Gruppe zu ermitteln (LL-AD vs. LD-AD).

Verminderungen im BDNF Anteil sind allerdings nicht zwangsläufig mit depressiven Symptomen bei Nagern assoziiert (de Foubert *et al.*, 2004; Ibarguen-Vargas *et al.*, 2009). Hellweg *et al.* (2007) berichten in Depressionsstudien an bulbektomierten Mäusen sogar von einem gesteigerten Anteil an BDNF bei Tieren mit einem depressiven Phänotyp. Auch Branchi *et al.* (2006) dokumentieren für Ratten einen gesteigerten BDNF mRNA Anteil im Hippocampus, der von einem depressionsähnlichen Verhalten begleitet wird. Keine Veränderung der hippocampalen BDNF Expression dokumentieren Vollmayr *et al.* (2001) nach Immobilisationsstress bei speziell auf Stresssensitivität gezüchteten Ratten (cLH), obwohl diese Tiere ein depressionsassoziierten Phänotyp aufweisen. Neben diesen Befunden besteht eine Parallele der hier vorgestellten Daten im Vergleich zu Daten von Garcia *et al.* (2009). Diese zeigen, dass durch die chronische Gabe des Glutamat-NMDA-Rezeptor-Liganden Ketamin ein depressionsähnliches Verhalten von Ratten nach chronisch mildem Stress aufgehoben wird, jedoch ohne den Anteil an BDNF zu verändern. Inwieweit Veränderungen im BDNF Anteil als Marker einer auftretenden Depressionssymptomatik im Tiermodell herangezogen werden können, bleibt demnach fraglich.

Auf der anderen Seite ist BDNF, neben weiteren neurotrophen Faktoren, für das Überleben und die Differenzierung von Nervenzellen notwendig sowie an der Modulation noradrenerger und serotonerger Netzwerke, einschließlich der nachgeordneten Systeme, beteiligt. BDNF ist somit maßgeblich an der Plastizität des Nervensystems beteiligt. Ein biologisches Korrelat dieser Plastizität stellt die Neurogenese im adulten Nervensystem dar (Gould und Tanapat 1999). Die Proliferation von Progenitorzellen und ihre Ausdifferenzierung in Nervenzellen, findet wesentlich in zwei Gehirnrealen statt: dem *Bulbus olfactorius* und dem Hippocampus. Da der Hippocampus als Teil des limbischen Systems bei Lernprozessen und Emotionalität involviert ist, werden Veränderungen der hippocampalen Neurogeneserate im Kontext humaner Depressionserkrankungen diskutiert (Brown *et al.*, 1999 und Jacobs *et al.*, 2000). Ebenso wird Neurogenese im *Gyrus dentatus* des Hippocampus vermehrt in Tiermodellen mit depressionsassoziierten Phänotypen untersucht (Sapolsky, 2004; Sahay und Hen, 2007). Ein möglicher Zusammenhang zwischen Neurogenese und depressiven Erkrankungen wird dabei durch die Tatsache gestützt, dass depressiogene Faktoren, wie erhöhte Corticosterolspiegel und Stress, in der Lage sind die Neurogeneserate im Hippocampus von Säugetieren zu reduzieren, während pharmakologische, antidepressive Maßnahmen die Neurogeneserate erhöhen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Anzahl an neu gebildeten Zellen im *Gyrus dentatus* in Bezug zu der verlängerten Lichtperiode und der antidepressiven Behandlung untersucht. Die absolute Anzahl neu gebildeter Zellen wurde dabei zusätzlich im Bezug zur hippocampalen Fläche analysiert. Diese Vorgehensweise war notwendig, da bildgebende Verfahren ein reduziertes hippocampales Volumen bei depressiven Patienten aufzeigen (Sheline *et al.*, 1996; Campbell and Macqueen 2004). Unter Anwendung dieser Methode wurde der Einfluss einer möglichen Volumenveränderung auf die zuvor ermittelten Ergebnisse ausgeschlossen. Die Ergebnisse der Auswertung zeigen, dass lichtexponierte Tiere sowohl absolut, als auch in Relation zur Fläche, eine signifikant erhöhte Anzahl neuer Zellen im Hippocampus besitzen.

Zusätzlich zu der quantitativen Untersuchung wurden die neu gebildeten Zellen durch den Nachweis des für Nervenzellen spezifischen Markers NeuN qualitativ untersucht. Es zeigte sich, dass innerhalb der neu entstandenen Zellen kein signifikanter Unterschied im Differenzierungsanteil der Nervenzellen bestand. Sofern sich in den vier analysierten Versuchsgruppen neue Zellen bildeten, war der Anteil der sich

daraus entwickelnden Neurone vergleichbar groß. Da Mäuse unter LL Bedingungen bereits eine signifikant erhöhte Anzahl neu gebildeter Zellen aufwiesen, konnte gleichzeitig ein signifikant größerer Anteil an Nervenzellen belegt werden. Diese Daten zeigen, dass der verlängerte Lichtzyklus bei den nachtaktiven C3H/HeN Mäusen neben einer erhöhten Proliferation der hippocampalen Zellen zu einer gesteigerten Neurogeneserate führt, die die depressionsähnliche Symptomatik begleitet.

Die Auswertung der medikamentös behandelten Mäuse unter LD Bedingungen, in Bezug zu Wasser trinkenden Tieren unter den gleichen Lichtbedingungen (LD-W vs. LD-AD), zeigt, dass allein die Gabe des Antidepressivums Imipramin die adulte Neurogenese im Hippocampus steigert. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit Befunden zu Ratten, bei denen die chronische Applikation diverser Antidepressiva, einschließlich Fluoxetin, die Neurogenese induziert (Malberg *et al.*, 2000). Ebenso berichten Sairanen *et al.* (2007) bei Ratten von einer Steigerung plastizitäts-assoziiierter Proteine im Hippocampus nach chronischer Behandlung mit Imipramin. Erstaunlicherweise zeigte der Vergleich der antidepressiv behandelten Tiere unter den zwei verschiedenen Lichtbedingungen (LL-AD vs. LD-AD) keine signifikanten Unterschiede. Die durch LL Bedingungen induzierte, signifikant erhöhte Neurogenese wurde in dieser Versuchsreihe durch die antidepressive Behandlung nicht zusätzlich erhöht.

Die vorliegenden Daten lassen die Hypothese zu, dass Imipramin einen regulativen Effekt auf die Neurogenese besitzt: Unter pathologischen Bedingungen, die eine herabgesetzte Zellproliferation im Hippocampus verursachen, vermag Imipramin die Neurogenese zu induzieren. Beim Auftreten einer drastisch erhöhten Neurogeneserate kann es allerdings auch der Neubildung von Nervenzellen entgegenwirken. Um diese Hypothese zu untermauern sind jedoch zukünftige Experimente erforderlich.

Die vorliegenden Ergebnisse belegen ferner, dass Licht eine fördernde Wirkung auf die Neurogenese hat. Dieser Befund stützt die Annahme, dass Lichttherapie als erfolgreiche Maßnahme zur Behandlung depressiver Patienten eingesetzt werden kann, bei denen eine verminderte Neurogenese vermutet wird (Wehr *et al.*, 1986; Lam *et al.*, 1989; Lam *et al.*, 2006). Ein definitiver Zusammenhang von verminderter Neurogenese und depressiven Erkrankungen wurde allerdings bis heute nicht hergestellt (Henn und Vollmayr, 2004) und wird immernoch kontrovers diskutiert (Santarelli *et al.*, 2003; Vollmayr *et al.*, 2003). Allerdings belegen Untersuchungen, dass neuronale Plastizität für einen Organismus unerlässlich ist, um sich einer neuen Umge-

bung oder pharmakologischen Stimuli anzupassen (O’Kneefe und Dostrovsky 1971; Kempermann, 2002; Lismann und Grace, 2005). Die Bildung neuer Neurone wird dabei als Voraussetzung für Lernen oder das Formen von Erinnerungen gesehen. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass eine Fehlregulation der Neurogenese zu einer schlechteren Adaptation und beeinträchtigten Denk- und Lernprozessen führt. Beeinträchtigung von Denkprozessen und Lernen gehören jedoch gerade zur Symptomatik depressiver Patienten. Ein Zusammenhang von Depression und Neurogenese scheint daher naheliegend. Eine veränderte Neurogenese bei SAD-Patienten, wurde bis heute allerdings nicht untersucht. Die in dieser Versuchsreihe dokumentierten Ergebnisse weisen erstmals auf einen tatsächlichen Zusammenhang zwischen Neurogenese, circadianer Rhythmik und depressiven Erkrankungen hin. Ferner lassen die Daten dieser Versuchsreihe vermuten, dass nicht nur eine verminderte Neurogenese mit dem pathologischen Erscheinungsbild der Depression verbunden ist, sondern dass auch eine vermehrte Neubildung von Nervenzellen im Hippocampus einen negativen Einfluss auf den Organismus ausüben kann. Weiterführende Untersuchungen anhand des hier vorgestellten neuen Tiermodells können diese Hypothese untermauern und gleichzeitig hilfreiche Erkenntnisse über den Einfluss von Licht und Lichttherapie in der speziellen Form der SAD liefern.

4.2 Illuminationsversuch 2

Mit Hilfe des Illuminationsversuchs 2 wurde das depressionsähnliche Verhalten der melatoninprofizienten C3H/HeN Mäuse unter konstanter Beleuchtung (24:0 Stunden Licht-Dunkel Rhythmus) reproduziert. Gleichzeitig wurde in dieser Versuchsreihe der Effekt von Fluoxetin und Melatonin auf das Verhalten der Tiere untersucht. Das Antidepressivum Fluoxetin wurde als Alternative zum Antidepressivum Imipramin gewählt, da es als selektiver Serotonin Rückaufnahmehemmer (SSRI) nicht die Wiederaufnahme von Noradrenalin beeinflusst. Zudem weisen SSRI behandelte Patienten im Vergleich zu Patienten mit trizyklischer Behandlung einen deutlich besseren Therapieverlauf auf (Souetre *et al.*, 1996). Die Gabe von Melatonin wurde ausgewählt, da melatoninprofiziente C3H/HeN Mäuse im Gegensatz zu melatonindefizienten C57BL/6J Mäusen sensitiv auf das verlängerte Lichtintervall reagierten (siehe Daten aus dem Vorversuch). Zudem wird die nächtliche Ausschüttung von Melatonin durch eine konstante Beleuchtung, mittels Hemmung der Hydroxyindol-O-Methyl-Transferase-Aktivität, unterbunden (Reiter, 1991; Ahrendt, 1995). Des Weiteren zei-

gen verschiedene, randomisiert durchgeführte Kurzzeitstudien antidepressive Effekte von Agomelatin, einem Naphtalenanalogon des Melatonins. Dieses verstärkt die Wirkung von Neurotransmittern im frontalen Kortex und fördert die Neurogenese im Hippocampus (Banasr und Duman, 2007). Da sich Agomelatin in ersten klinischen Studien durch seine antidepressiven Effekte auszeichnet wird als neues Antidepressivum diskutiert (Fuchs *et al.*, 2006; Pandi-Perumal *et al.*, 2006 und Goodwin, 2008). Auf molekularer Ebene wirkt Agomelatin agonistisch an den Melatoninrezeptoren MT1 und MT2 und antagonistisch am 5-HT_{2C} Serotoninrezeptor. Eine Verknüpfung seines antidepressiven Effekts mit der Monoamin-Mangel-Hypothese der Depression ist daher denkbar.

Die Auswertung der Verhaltensversuche zeigte, dass die chronische Verlängerung der täglichen Lichtperiode im Illuminationsversuch 2 bei Wasser trinkenden C3H/HeN Mäusen mit einer Reihe von Verhaltensänderungen verbunden war. Lichtexponierte Tiere zeigten Hypoaktivität im Heimkäfig, eine reduzierte Sucrose-Präferenz, und Hyperaktivität bei Konfrontation mit der Offenfeld-Arena. Diese unabhängigen Experimente bestätigen die Ergebnisse des Illuminationsversuch 1. Das hier vorgestellte neue Modell induziert durch Verlängerung des Lichtintervalls beständig einen depressionsassoziierten Phänotyp bei C3H/HeN Mäusen und zeichnet sich damit besonders durch eine verlässliche Reproduzierbarkeit aus. Die orale Gabe von Melatonin wirkte in dieser Versuchsreihe einer Abnahme der Sucrose-Präferenz entgegen. Eine Behandlung mit Fluoxetin dagegen, verhinderte das Auftreten von Anhedonie und war in der Lage, den hyperaktiven Phänotyp im Offenfeld zu unterbinden. Ein gegenüber Antidepressiva sensibler Phänotyp wurde, wenn auch nicht in allen vorgestellten Parametern, in dieser Versuchsreihe unabhängig bestätigt. Ferner verdeutlicht diese Versuchsreihe, dass nicht nur das trizyklische Antidepressivum Imipramin, sondern auch der SSRI Fluoxetin das Auftreten der depressionsassoziierten Symptome, wie Anhedonie und Hyperaktivität im Offenfeld, moduliert. Die reduzierte Heimkäfigaktivität der Tiere in dieser Versuchsreihe war jedoch weder durch die Behandlung mit Fluoxetin, noch durch die Gabe von Melatonin zu beeinflussen.

Da bei depressiven Patienten neben einer reduzierten Motivation häufig eine Abnahme des sozialen Interesses dokumentiert wird (Ohl und Keck 2003), wurde im Illuminationsversuch 2 zusätzlich das Verhalten der C3H/HeN Mäuse in Bezug auf ihre soziale Kontaktfreudigkeit untersucht. Die Zeit, die eine Maus in Kontakt mit

einem Artgenossen verbrachte, wurde in Anlehnung an Versuche von Moy *et al.* (2004) als Indikator für ihre soziale Affinität gewertet. Die vorliegenden Daten zeigten, dass die konstante Beleuchtung zu einem verringerten Interesse an Artgenossen und zu einer Abnahme der sozialen Affinität führte. Dieser Effekt war gegenüber der Behandlung mit Fluoxetin bzw. Melatonin sensitiv und wurde in den pharmakologisch behandelten Gruppen nicht beobachtet. Das hier vorgestellte Mausmodell belegt somit ein weiteres Kernsymptom der humanen Depression, das durch antidepressive Behandlung beeinflusst wird. Dieser Befund steigert weiter die Validität dieses neuen Mausmodells zur Erforschung depressiver Erkrankungen.

Neben den modulierenden Eigenschaften von Fluoxetin, wird in der hier vorgestellten Arbeit auch ein Einfluss von Melatonin gezeigt. Obwohl Melatonin nicht in allen untersuchten Parametern effektiv war, beeinflusste es zumindest teilweise die aufgetretene depressionsähnliche Symptomatik. Anhedonie und eine reduzierte soziale Affinität wurden unter Melatoninbehandlung nicht festgestellt. Diese Ergebnisse lassen antidepressive Eigenschaften von Melatonin vermuten. Ein möglicher Zusammenhang von Melatonin und Depression wird in der Literatur allerdings kontrovers diskutiert. Reduzierte Melatoninkonzentrationen im Blut und ein Trend zu einer Phasenverzögerung des Melatoninrhythmus werden zwar für eine Vielzahl an Gemütskrankungen berichtet (Claustrat *et al.*, 1984; Paccierotti *et al.*, 2001; Crasson *et al.*, 2004), doch eine direkte Behandlung mit Melatonin bei therapieresistenten, depressiven Patienten führte trotz einer verbesserten Schlafqualität nicht zu einer deutlich verbesserten Depressionssymptomatik (Dalton *et al.*, 2000). Die vorliegenden Ergebnisse lassen jedoch eine Beteiligung melatoninassoziierter Mechanismen bei depressiven Erkrankungen als möglich erscheinen und machen den Bedarf an detaillierten, weiterführenden Untersuchungen offensichtlich. Das in dieser Studie eingesetzte Melatonin stand den Tieren allerdings *ad libitum* im Trinkwasser zur Verfügung. Alle Effekte, die einen pulsatilen Konzentrationsanstieg benötigen, wurden durch den gewählten Versuchsansatz unterbunden. Eine interessante Fragestellung für ein weiteres Projekt ist daher, inwiefern sich eine regelmäßige Injektion von Melatonin positiv auf den lichtinduzierten, depressionsähnlichen Phänotyp auswirkt und inwieweit sich Unterschiede in Bezug auf eine Behandlung mit Agomelatin ergeben.

Außer einer veränderten Gefühlslage werden depressive Erkrankungen häufig von neuroanatomischen Veränderungen begleitet. Dies lässt sich anhand von Schlaf- und Essstörungen, Veränderungen im Körpergewicht und neuroendokrinen

Abweichungen bei depressiven Patienten erkennen (Bartolomucci und Leopardi, 2009). Im Verlauf dieser Versuchsreihe wurden daher Hinweise auf veränderte metabolische Prozesse untersucht. Das Körpergewicht sowie der Futterkonsum der Tiere wurden während der Versuchsreihe ermittelt und analysiert. Die Auswertung dieser Daten belegte, dass C3H/HeN Mäuse unter konstanter Beleuchtung mehr an Körpergewicht zunahmen, als Tiere unter einem 12:12 Stunden Licht-Dunkel Zyklus (LD). Erstaunlicher Weise ist der Futterkonsum der lichtexponierten Tiere (LL) dabei geringer, als der von Mäusen unter LD Haltungsbedingungen. Mäuse unter LL Bedingungen zeigten demnach eine höhere kalorische Effizienz bzw. einen reduzierten Energiebedarf. In Übereinstimmung mit diesen Befunden sind eine stressbedingte Zunahme des Körpergewichts sowie eine gesteigerte Neigung zu Fettleibigkeit neben anderen Depressionssymptomen für das Mausmodell der sozialen Unterordnung dokumentiert (Moles *et al.*, 2006). Ein adipöses Erscheinungsbild ist zudem für BDNF Knockout-Mäuse charakteristisch, die zugleich einen hyperaktiven Phänotyp zeigen (Rios *et al.*, 2001). Darüber hinaus ist eine Komorbidität von depressiven Erkrankungen mit Adipositas für atypisch verlaufende Depressionen, zu denen auch die SAD gehört, verzeichnet (Stunkard *et al.*, 2003). Weiterhin decken sich die hier vorgestellten Daten mit Ergebnissen von Sacharczuk *et al.* (2010), die für Mäuse ein depressionsähnliches Verhalten nach chronisch mildem Stress zeigen, das von einer heraufregulierten Funktion des Opioidrezeptor-Systems und einem herabgesetzten Energiebedarf begleitet wird. Gerade unter Verwendung des chronisch milden Stresses wird allerdings ebenso von einer Reduktion des Körpergewichts als Depressionssymptomatik berichtet (Willner, 1997). Als humane Parallele ist Gewichtsabnahme für Depressionen mit einem typischen Verlauf charakteristisch.

Die hier zusammengetragenen Befunde verdeutlichen die Wichtigkeit und Notwendigkeit zwischen den unterschiedlichen Formen depressiver Erkrankungen zu differenzieren. Es sollte daher nicht nur bei Patienten, sondern auch im Tiermodell zwischen typischen und atypischen Depressionen unterschieden werden. Eine solche Vorgehensweise würde die Einteilung der bisherigen Depressionsklassifizierung verbessern und gleichzeitig die bisherigen Tiermodelle besser nutzbar machen. Denkbare Marker für eine solche Unterscheidung sind, nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, stressbedingte Gewichtszunahme bzw. -abnahme sowie Hypo- und Hyperaktivität in vertrauter und fremder Umgebung. Diese Parameter lassen ferner vermuten, dass bei einzelnen Subtypen depressiver Erkrankungen verschiedene

molekulare Mechanismen involviert sind. Als Konsequenz bedeutet dies, dass die Erforschung der zugrunde liegenden Pathomechanismen depressiver Erkrankungen mit Hilfe der derzeit existierenden Tiermodelle erschwert ist.

Eine Schlüsselfunktion bei depressiven Erkrankungen kommt nach klinischen Befunden bildgebender Studien neben dem Hippocampus (involviert in Lernen und Gedächtnis) und dem Hypothalamus (beteiligt an der Steuerung vieler vegetativer Funktionen wie Thermoregulation und Energieaufnahme), auch dem frontalen Kortex zu (Drevets *et al.*, 1997; Bremner *et al.*, 2002). Unterstützt wird diese Annahme durch Genexpressionsanalysen von postmortalem Gewebe depressiver Patienten (Iwamoto *et al.*, 2004; Ryan *et al.*, 2006) und einer DNA-Microarray Analyse von Ratten (Orsetti *et al.*, 2008). Die Ergebnisse der Rattenstudie belegen Modifikationen der Genexpression im frontalen Kortex nach chronisch mildem Stress, die zusammen mit einem anhedonischen Phänotyp auftreten. Da die Resultate der hier durchgeführten Experimente darauf hindeuteten, dass eine Verlängerung der Lichtperiode zu einem depressionsähnlichen Verhalten führt, wurde eine vergleichbare Microarray-Studie vom mPFC der Versuchsmäuse durchgeführt. Die Grenze der differentiellen Expression wurde mit der 1,5-fachen Expressionsstärke zur Kontrollgruppe gewählt. Die Expressionsstärke lag unterhalb der üblichen Grenze von 2,0-fach, jedoch genauso hoch wie in der Studie von Orsetti *et al.* (2008). Der Grund für diese niedrige differentiellen Expressionsgrenze ist in der Wahl des milden Stressors „Licht“ begründet. Ausgehend von vergleichbaren Studien der Genexpression nach Anwendung von Elektroschocks, körperlichem Fixierungsstress oder nach chronisch mildem Stress, kann davon ausgegangen werden, dass eine geringe Stimulation des Verhaltens in einer geringen Veränderung der Genexpression resultiert. Zudem ist zu bemerken, dass sich die geringe differentielle Expression aus der Gesamtheit aller Zellen in der jeweiligen Probe ergibt. Die tatsächlich veränderte Expression in einem speziellen Zelltyp, kann dabei deutlich höher liegen.

Unter Verwendung dieser Kriterien wurden bei Wasser trinkenden Tieren (LL vs. LD) 104 differentiell exprimierte Transkripte identifiziert. Eine wesentlich größere Anzahl an regulierten Transkripten war allerdings bei Mäusen festzustellen, die eine antidepressive Behandlung erhielten und den zwei unterschiedlichen Lichtbedingungen ausgesetzt waren (LL F vs. LD F). Diese Befunde lassen vermuten, dass die medikamentöse Behandlung eine differentielle Expression induziert, die additiv zu der bereits ausgelösten, lichtbedingten Veränderung des mRNA Levels eintrat. Fluo-

xetin könnte so zusätzlich Transkriptveränderung auslösen, die für eine Kompensierung der Depressionssymptomatik verantwortlich sind. Die relativ niedrige Anzahl der Kandidatengene in der nicht medikamentös behandelten Gruppe (104) korreliert gut mit der Studie von Orsetti *et al.* (2008), die 59 differenziell expremierte Gene bestimmen. Der weitere Vergleich zeigte 22 übereinstimmende Transkripte, die signifikant reguliert waren und oberhalb der 1,0-fachen Expressionsgrenze lagen. Das entspricht einer Übereinstimmung von mehr als 37%. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass in beiden Modellen ähnliche, transkriptionelle Mechanismen betroffen sind, die in zwei verschiedenen Spezies und durch unterschiedliche Methoden in einem ähnlichen Phänotyp resultieren. Dieser Befund kann als zusätzliches Validitätskriterium für das vorliegende Mausmodell betrachtet werden.

Bei den übereinstimmenden Kandidaten handelt es sich um Btg1, Junb, Gdi2, 2610528E23Rik, SLC17a6, Gng13, Rod1, Egr2, Ptgds, Fos, Anapc10, Syt17, Phactr1, Slc1a3, Gja5, Senp7, Attp1a2, Itga4, Homer1, Camk1d, Plcb4 und Nfic. Der etwa doppelt so große Anteil an signifikant regulierten Genen in der vorliegenden Studie - im Vergleich zu der Orsetti-Studie- kann durch die Anwendung eines einzigen Stressors bedingt sein. Ein einzelner Stressor resultiert in einer geringeren Variabilität der Expression zwischen den einzelnen Proben, als eine Mischung aus diversen Stressoren (wie im Modell des chronisch milden Stresses). Dies ist dadurch bedingt, dass verschiedene Stressoren individuell auf die Versuchstiere einwirken und in ihrer Kombination die Expression beeinflussen. Mit Hilfe der qRT-PCR wurden in der vorliegenden Arbeit von 104 Kandidaten vier (Homer1, Egr2, Kalrn und Drd1a2) bestätigt. Bei den ausgewählten Transkripten handelte es sich um Gene, die sich aufgrund ihrer stark differenziellen Expression anboten und die technischen Voraussetzungen zur Validierung mit Hilfe der qRT-PCR erfüllten.

Homer1, Egr2 und Nr4a2 gehören ferner zur Gruppe der so genannten „immediate early genes“ (IEGs). Diese reagieren mit Induktion der Protein-Neusynthese auf einen initialen Stimulus und ermöglichen kurzfristig eine Anpassung der Zelle an sich verändernde Bedingungen. Eine andauernde Induktion dieser IEGs ist für Entwicklungsprozesse, Zell-Zyklus-Kontrolle, synaptische Plastizität und die Immunantwort belegt (Lanahan und Worley 1998, Murphy und Blenis 2006, Simon *et al.*, 2006). Eine aktivierte Transkription als Reaktion auf verschiedene pharmakologische Stressoren und Stressfaktoren der Umwelt, ist dagegen speziell für Homer1a dokumentiert (Klugmann *et al.*, 2005). Dieses Ergebnis stimmt gut mit den hier beschrie-

benen Befunden und den Daten aus dem Vorversuch überein. Erhöhte mRNA Werte des *Egr2*-Gens, wie in der vorliegenden Arbeit, sind ebenfalls nach Anwendung des Modells vom chronisch milden Stress nachgewiesen (Orsetti *et al.*, 2008). Parallelen des hier vorgestellten innovativen Modells der lichtinduzierten Depression im Vergleich zum etablierten Modell des chronisch milden Stresses sind folglich nicht von der Hand zu weisen und stärken die Validität des hier vorgestellten neuen Modells bei gleichzeitiger Betonung seiner Simplizität.

Ein direkter Zusammenhang von einer veränderten Kalirin (Klrrn) Expression mit dem Auftreten depressiver Symptome ist bisher nicht belegt. Es gibt jedoch Studien, die eine verminderte Expression von Kalirin im präfrontalen Kortex bei Schizophreniepatienten und Alzheimer-Erkrankten dokumentieren (Hill *et al.*, 2006 und Youn *et al.*, 2007). Kalirin ist ein GDP/GTP Austauschfaktor, dessen Expression auf bestimmte Gehirnbereiche beschränkt ist. Zu diesen Bereichen zählen der Hippocampus und der präfrontale Kortex (Ma *et al.*, 2001). Beide werden häufig im Zusammenhang mit neuropsychiatrischen Erkrankungen diskutiert. Kalirin ist in postsynaptischen Verdichtungen dendritischer Spines angereichert, in denen es ihre Morphologie kontrolliert. Auch bei der aktivitätsabhängigen Vergrößerung von Spines, der synaptischen Expression von AMPA Rezeptoren und der AMPA-vermittelten synaptischen Transmission spielt Kalirin eine entscheidende Rolle (Xie *et al.*, 2007). Für AMPA Rezeptoren, die selbst zur Gruppe der Glutamaterezeptoren gehören, legen diverse Studien eine Beteiligung bei Depressionserkrankungen nahe (Alt *et al.*, 2006; Mathew *et al.*, 2008, Hashimoto, 2010).

Interessanterweise befanden sich unter den differenziell expremierten Genkandidaten der hier durchgeführten Microarray Analyse ebenfalls Transkripte, die eine Beteiligung des glutamatergen Systems bei der Entstehung depressiver Erkrankungen vermuten lassen. Dabei handelte es sich um den glialen Glutamat-Aspartat-Transporter (als Slc1a3, EEAT1 oder auch GLAST bezeichnet) und den neuronalen, vesikulären Glutamat-Transporter (als Slc17a6 oder VGLUT2 bezeichnet). Der Glutamat-Aspartat-Transporter ist für die Elimination von Glutamat aus dem synaptischen Spalt durch Aufnahme in Gliazellen und die Termination der Signalweiterleitung verantwortlich. Dieses Transkript war heraufreguliert. VGLUT2 ist dagegen in Neuronen bei der Akkumulation von Glutamat in den synaptischen Vesikeln beteiligt und lag in einer verringerten Expressionsstärke vor. Zur Zeit existieren mehrere Hinweise auf eine Beteiligung des glutamatergen Systems bei depressiven Erkrankun-

gen (Machado-Vieira et al., 2009, Valentine und Sanacora, 2009, Hashimoto, 2010). Zusätzlich werden immer mehr Einflüsse von Stress auf die glutamaterge Neurotransmission in Verbindung mit der Pathogenese von Depressionserkrankungen gebracht (McEwen und Magarinos, 1997; Sapolsky, 2000; Banasr und Duman, 2007 sowie Rajkoska und Miguel-Hidalgo, 2007). In diesem Kontext ist die Rolle von Gliazellen bei der regulativen Funktion des Aminosäuren-Neurotransmitter-Systems durch Entfernung von Glutamat aus dem synaptischen Spalt mittels exzitatorischer Aminosäuretransporter (EEATs) von besonderer Bedeutung. Eine beeinträchtigte Funktionsweise von Gliazellen, die mit einer erhöhten glutamatergen Aktivierung an der extrasynaptischen Seite einhergeht wird inzwischen für Depressionserkrankungen postuliert. Ferner sind Fehlfunktionen in Gliazellen für die Vermittlung neurotoxischer Effekte nachgewiesen (Hardingham, 2006; Soriano und Hardingham, 2007 sowie Banasar *et al.*, 2010). Eine Beeinträchtigung der glutamatergen Neurotransmission kann als eine weitere mögliche Ursache des in dieser Arbeit vorgestellten Phänotyps von lichtexponierten Tieren vermutet werden und sollte in Folgeexperimenten detaillierter untersucht werden.

Chronischer Stress führt allerdings auch zu einer verminderten dopaminergen Transmission im mPFC (Mizoguchi *et al.* 2002). Als denkbare Konsequenz ist eine Stimulation des Dopaminrezeptors hypothetisch in der Lage, einen depressiven Phänotyp nach chronischem Stress abzuschwächen. Übereinstimmend mit dieser Theorie ist eine Desensitivierung des Dopaminrezeptors 1 (Drd1) im Depressionsmodell der erlernten Hilflosigkeit bei Ratten dokumentiert und wird dort wegen seiner Sensitivität gegenüber der antidepressiven Behandlung als depressionsassoziiertes Marker interpretiert (Gambarana *et al.*, 1995). Analog zu diesen Befunden sind in der hier vorgestellten Arbeit geringere Expressionswerte des Drd1a Gens dokumentiert, die von einem depressiven Phänotyp begleitet wurden.

Die Ergebnisse des Illuminationsversuchs 2 bestärken die Annahme, dass ein depressionsähnlicher Zustand bei C3H/HeN Mäusen durch eine verlängerte Lichtperiode erzeugt wird. Dieser Zustand wird von einer Vielzahl an Veränderungen der Genexpression im frontalen Kortex begleitet und bietet dadurch neue therapeutische Ansatzpunkte zur Behandlung humaner Depressionserkrankungen. Gleichzeitig offeriert das hier vorgestellte, innovative Depressionsmodell die Möglichkeit die Pathomechanismen zu erforschen, die dem induzierten Syndrom zugrunde liegen.

4.3 Illuminationsversuch 3

Im Kontext humaner Depression wird vermehrt sozialer Stress als pathogener Faktor im Gegensatz zu physikalischem Stress gesehen (Blazer und Hybels 2005). Dabei gilt besonders Einsamkeit als prägnanter Vorläufer depressiver Erkrankungen (Heinrich und Gullone 2006; Bekhet *et al.*, 2008). Es wäre daher denkbar, dass soziale Isolation ebenso bei Nagern für das Entstehen eines depressiven Phänotyps verantwortlich ist. Für Präriewühlmäuse ist soziale Isolation mit dem Auftreten depressionsähnlicher Symptome belegt. Diese manifestieren sich in Form einer reduzierten Sucroseaufnahme (Anhedonie) und erhöhten Corticosteronwerten als Reaktion auf Stress (Anisman und Matheson, 2005; Grippo *et al.*, 2007). Bei weiblichen CD1 Mäusen führt Langzeit-Isolierung entsprechend zu einem ängstlichen sowie gestressten Verhalten (Palanza, 2001). Auch weibliche C57BL/6J Mäusen zeigen als Reaktion auf Isolationsstress einen depressionsähnlichen Phänotyp (Martin und Brown 2010). Als Depressionssymptomatik werden in der letzteren Studie ein signifikanter Anstieg im Gewicht sowie eine gesteigerte Immobilität im FST und TST dokumentiert.

Im Rahmen des Illuminationsversuches 3 wurden männliche C3H/HeN Mäuse unter LL und LD Haltungsbedingungen analysiert, die diesmal in Sechsergruppen gehalten wurden. Auf diese Weise sollte die Einzelhaltung der Mäuse als mögliche Ursache für die lichtbedingte, depressionsassoziierte Symptomatik der Illuminationsversuche 1 und 2 ausgeschlossen werden. Als Vergleich zu den zuvor erhobenen Daten, wurden die Aktivität der Tiere im Heimkäfig, das Verhalten im Offenfeld, Corticosteronwerte und das Nebennierengewicht bestimmt. Zusätzlich wurde das Angstverhalten im NSF-Test, das Körpergewicht nach wiederholter BrdU Injektion und ultradiane Schwankungen in der CRH Rezeptor 1 Transkriptmenge untersucht. Die Auswertung der Daten belegt, dass auch in Gruppen gehaltene C3H/HeN Mäuse unter LL Bedingungen ihre Heimkäfigaktivität signifikant reduzierten. Die Aktivitätsmaxima dieser Mäuse sind verschoben und erreichen nicht die Werte von Tieren unter LD Haltungsbedingungen. Im Offenfeld war zu verschiedenen Tageszeiten ein hyperaktiver Phänotyp bei lichtexponierten Mäusen festzustellen. Die gesteigerte Aktivität im Offenfeld wird somit als ein robuster Phänotyp und Marker für die depressionsähnliche Symptomatik in dem Modell der lichtinduzierten Depression angesehen. Er tritt sowohl bei Einzel- als auch bei Gruppenhaltung auf und wird durch eine

Verlängerung der Lichtbedingungen induziert. Die Auswertung des NSF-Tests zeigte zudem, dass das Angstverhalten der Mäuse unter beiden Lichtbedingungen vergleichbar war. Ein ängstliches Verhalten in dieser Versuchsreihe wird deshalb, und in Bezug zu den Ergebnissen der Offenfeld-Daten im Illuminationsversuch 1, ausgeschlossen.

Interessant in dieser Versuchsreihe war die Feststellung, dass C3H/HeN Mäuse unter den 12:12 Stunden Licht-Dunkel Haltungsbedingungen mit einem signifikanten Verlust des Körpergewichtes auf die dreitägige Applikation von BrdU reagierten. Lichtexponierten Mäuse zeigten dagegen keinen Gewichtsverlust als Resultat der Injektionen. Dieses unerwartete Phänomen kann dadurch zustande gekommen sein, dass Mäuse unter LL Haltungsbedingungen bereits so gestresst waren, dass der zusätzliche Stressor (Injektion) keinen signifikanten Einfluss mehr ausüben konnte. Mäuse unter den Standardhaltungsbedingungen (LD Haltungsbedingungen) reagierten dagegen mit Gewichtsverlust auf den Injektionsstress.

Als molekulare Reaktion schütten Nager bei Stress Corticosteroide von der Nebennierenrinde aus. Die Freisetzung unterliegt allerdings auch bei den ungestressten Tieren einer ultradianen Rhythmik (Stavreva *et al.*, 2009). Innerhalb des Illuminationsversuchs 3 wurde daher der Corticosteronspiegel zu verschiedenen Zeiten während der Dunkelphase bestimmt und das Nebennierengewicht aller Mäuse ermittelt. Auch während der Dunkelphase wiesen in Gruppen gehaltene LL Tiere signifikant höhere Corticosteronwerte auf, als die LD Kontrollmäuse. Die postmortale Analyse der Nebennieren belegte, dass in Gruppen gehaltene Tiere signifikant schwerere Nebennieren besaßen, sofern sie unter LL Bedingungen gehalten wurden. Diese Befunde stimmen mit den zuvor erhobenen Daten einer induzierten Hyperplasie von isoliert gehaltenen C3H/HeN Mäuse überein. Sowohl die größeren Nebennierengewichte, als auch der erhöhte Corticosteronspiegel im Blut lassen bei dem hier vorgestellten Modell eine chronische Hyperaktivität der HHN-Achse vermuten. Ein Einfluss einer ultradian schwankenden CRH Rezeptor 1 mRNA Expression auf die vorgestellten Messergebnisse wurde ausgeschlossen, da die Transkripte in einer vergleichbaren Expressionsstärke zu verschiedenen Tageszeiten vorlagen.

Zusammenfassend zeigen die Daten des Illuminationsversuch 3, dass der Phänotyp von vergesellschafteten, adulten, männlichen C3H/HeN Mäusen vergleichbar mit den Ergebnissen der Tiere unter Einzelhaltung war. Soziale Isolation hat demnach in

dem hier vorgestellten, innovativen Modell der lichtbedingten Depression keinen signifikanten Einfluss auf die untersuchten Parameter und kann in zukünftigen Untersuchungen vernachlässigt werden.

Wichtige Informationen für die erfolgreiche Durchführung der vorgestellten Illuminationsversuche 1 bis 3 stammten allerdings sowohl aus dem 24 h Profil, als auch aus dem Vorversuch. Die Ergebnisse des 24 h Profils verdeutlichten die Notwendigkeit, die circadiane Rhythmik der Tiere in den Illuminationsversuchen zu berücksichtigen. Der Vorversuch dagegen wies auf C3H/HeN Mäuse als eine geeignete Zuchtlinie für die angestrebten Experimente hin. Zusätzlich gab der Vorversuch den Anlass eine mögliche Involvierung der HHN-Achse bei der auftretenden depressionsassoziierten Symptomatik zu untersuchen.

4.4 24 h Profil

Eine konstante Beleuchtung resultiert in einem freilaufenden endogenen Rhythmus (Aschoff, 1955). Im Rahmen des hier vorgestellten Versuchs wurde deshalb untersucht, ob die gemessenen Verhaltensmuster der Tiere von der Tageszeit des Tests abhängig sind. Die Auswertung dieser 24 h Profile zeigte, dass es zu den verschiedenen Tageszeiten signifikante Unterschiede sowohl im Verhalten der Tiere, als auch auf molekularer Ebene gibt. Eine tageszeitlich abhängige Performance der Mäuse in den gängigen Verhaltenstests wie Offenfeld, FST und TST ist anhand der vorliegenden Versuchsreihe eindeutig belegt.

Im Kontext depressiver Erkrankungen werden besonders häufig Mausinzuchtlinien in den angeführten Versuchen untersucht. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass bei diesen Tieren aufgrund ihres homozygoten Genoms ein weitgehend einheitlicher Phänotyp erwartet wird. Zusätzlich sind molekulare Unterschiede bei der Verwendung dieser Inzuchtlinien leichter aufzudecken, als es bei heterogenen Untersuchungsgruppen der Fall ist (Crawley *et al.*, 1997; Rossi-Arnaud & Ammassari-Teule, 1998). Doch selbst unter Verwendung dieser Mausinzuchtlinien existiert in der Literatur ein großes Spektrum an widersprüchlichen Ergebnissen. Der genetische Hintergrund der jeweils verwendeten Mausinzuchtstämme wird in diesem Kontext als mögliche Ursache für die Varianz diskutiert (Jacobson und Cryan 2007). Nach den Daten der vorliegenden Arbeit ist jedoch auch die jeweils gewählte Tageszeit für einen Versuch von entscheidender Bedeutung. Allein durch diesen Faktor können wi-

dersprüchliche Testergebnisse bedingt sein. Um eine Vergleichbarkeit von Versuchsergebnissen zu erreichen, scheint es auf Basis der hier vorgestellten Daten sinnvoll zu sein, bei jedem durchgeführten Verhaltensversuch neben der verwendeten Mauslinie auch die genaue ZT Zeit zu dokumentieren. Ferner sollte bei Tests stets auf die circadiane Rhythmik der Versuchsgruppen geachtet werden. Gerade in Stressmodellen der Depression, die einen depressionsähnlichen Phänotyp durch Konfrontation mit variierenden Umgebungsreizen induzieren, ist eine Verschiebung der circadianen Rhythmik höchst wahrscheinlich. Als Folge des verschobenen Rhythmus können Versuchsergebnisse verzerrt sein, oder sogar Unterschiede von Testgruppen abgebildet werden, die keine biologische Relevanz besitzen. Anschaulich kann dies anhand der hier vorgestellten, tageszeitlich schwankenden Corticosteronwerte verdeutlicht werden. Werden zwei Tiergruppen zu einem Zeitpunkt verglichen, bei dem die Kontrollgruppe einen Maximum-Wert aufweist, ist es höchst wahrscheinlich, einen kleineren Messwert in der Testgruppe zu erzielen, sofern die circadiane Rhythmik nur geringfügig verschoben ist. Gerade dem Phänomen von ultradianen Corticosteronschwankungen wird in der Literatur allerdings wenig Beachtung geschenkt und dies, obwohl dieser Blutparameter häufig in Depressionsmodellen analysiert wird.

Viele Depressionsstudien suggerieren bei Nagern sogar generell niedrige Corticosteronwerte während der Hellphase und höhere Werte während der Dunkelphase (Le Minh *et al.*, 2001; de Kloet, persönliche Korrespondenz). Die Wichtigkeit einer pulsatilen, ultradianen Sekretion von Corticosteroiden bei der Regulation physiologischer Prozesse ist allerdings für Ratten im Rahmen einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung belegt (Stavreva *et al.*, 2009). Diese Befunde lassen die Forderung aufkommen, bei Tiermodellen depressiver Erkrankungen, das Augenmerk nicht nur auf die Messergebnisse der Corticosteronwerte zu einem bestimmten Zeitpunkt zu richten. Vielmehr sollten chronische Aspekte einer generell erhöhten Corticosteronsekretion, wie beispielsweise Hyperplasie der Nebennieren, in Betracht gezogen werden.

Nach den Daten der vorliegenden Arbeit ist bei der Auswertung von Versuchsergebnissen die circadiane Rhythmik ein entscheidender Faktor. Ermittelte Unterschiede bzw. das Fehlen von signifikanten Unterschieden können lediglich durch eine verschobene circadiane Rhythmik bedingt sein. Es ist beispielsweise nicht auszuschließen, dass gesunde Mäuse in einem Test einen depressiven Phänotyp zeigen,

sofern der Test zu einer anderen Tageszeit durchgeführt wird. Des Weiteren besteht theoretisch die Möglichkeit einen „antidepressiven“ Phänotyp durch die regelmäßige Applikation einer beliebigen Substanz zu induzieren, der lediglich durch die Regelmäßigkeit ihrer Anwendung und einer dadurch bedingten Resynchronisation der inneren Uhr resultiert. Der auftretende Effekt kann dabei völlig ungekoppelt von dem direkten Wirkmechanismus der Substanz sein und lediglich durch die stets zur selben Zeit ausgelösten, metabolischen Prozesse bedingt sein. Dieser Aspekt wird in der aktuellen Literatur jedoch nicht erwähnt. Auch in Tiermodellen der Depression spielen circadiane Rhythmen bisher, wenn überhaupt, eine nebensächliche Rolle. Auf der anderen Seite ist bis heute ein direkter Zusammenhang zwischen einer verbesserten Depressionssymptomatik und einer Resynchronisation der endogenen Rhythmik nicht bewiesen. Allerdings ist für SAD-Patienten unter Lichttherapie eine Linderung der Depressionssymptome belegt, die mit einer Stabilisierung der circadianen Rhythmik assoziiert wird. Ein Behandlungserfolg der Lichttherapie durch Resynchronisation der inneren Uhr ist folglich naheliegend - aber nicht bewiesen.

4.5 Vorversuch

Das Ziel des Vorversuchs bestand darin einen geeigneten Mausinzuchtstamm für die geplanten Experimente auszuwählen. Da bereits im Vorfeld die Spekulation über Melatonin als modulierender Faktor aufkam, wurde im Vorversuch das Verhalten von melatoninprofizienten C3H/HeN und melatonindefizienten C57/BL/6J Mäusen verglichen. Die Auswertung zum Konsumverhalten der Tiere gegenüber einer 1%igen Saccharinlösung zeigte, dass eine sechswöchige Beleuchtung keine Abnahme in der Saccharin-Präferenz induzierte. Wie sich herausstellte war das Verhalten der C3H/HeN Mäuse jedoch durch das Vorliegen des „nontaster“ Allels bedingt. Anhedonie konnte bei den C3H/HeN Mäusen folglich in diesem Experiment nicht bewertet werden. C57BL/6J Mäuse besitzen im Gegensatz zu den C3H/HeN Mäusen das „taster“ Allel, daher war es möglich Anhedonie gegenüber einer 1%igen Saccharinlösung bei dieser Mauslinie zu untersuchen. Es zeigte sich, dass sich die konstante Beleuchtung nicht auf das Konsumverhalten der melatonindefizienten C57/BL/6J Mäuse auswirkte. Die Präferenzwerte aller C57/BL/6J Mäuse lagen zu Versuchsbeginn oberhalb von 80%. Eine Abnahme im Präferenzverhalten war bei dieser Mauslinie auch am Ende der Versuchsreihe nicht zu belegen. Die veränderten Lichtbedin-

gungen lösten demnach bei den melatonindefizienten Mäusen keinen depressionsassoziierten Phänotyp aus.

Neben der genetisch determinierten Wahrnehmung von süßen Substanzen, weist die verwendete C3H/HeN Mauslinie zusätzlich eine homozygote Erbanlage für retinale Degradation (rd/rd) auf. Das Photorezeptorsystem adulter rd/rd Mäuse besitzt keine lichtempfindlichen Stäbchen und auch die Anzahl der Zapfen für die Farbwahrnehmung ist deutlich minimiert (Carter-Dawson *et al.*, 1978). Trotz dieses Mangels zeigen rd/rd Mäuse einen lichtgesteuerten, circadianen Rhythmus, der sich nicht vom Rhythmus anderer Mauslinien unterscheidet (Foster *et al.*, 1993). Die Synchronisation der inneren Uhr wird dabei dem opsinbasierten Photopigment Melanopsin in den retinalen Ganglienzellen zugesprochen. Mit Hilfe dieses Opsins wird auch bei gänzlichem Fehlen der Photorezeptoren (Zapfen und Stäbchen) ein Entrainment gewährleistet (Panda *et al.*, 2002). Da die Auswertung der Aktivitätsprofile in den Illuminationsversuchen ebenfalls ein Entrainment für die adulten C3H/HeN Mäuse belegte, kann ein Einfluss der rd-Mutation auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse des Offenfeld-Tests vom Vorversuch zeigten zudem, dass eine vierwöchige Veränderung der Lichtbedingungen bei C57BL6/J Mäusen keine Verhaltensänderung induzierte. Sowohl die horizontale Aktivität, als auch die vertikale Aktivität ist bei den melatonindefizienten Mäusen unter LL und LD Haltungsbedingungen gleich. Im Gegensatz dazu zeigten melatoninprofiziente C3H/HeN Mäuse in diesem Verhaltenstest einen hyperaktiven Phänotyp. C3H LL Mäuse legten in der gleichen Zeit eine signifikant größere Distanz zurück als C3H LD Tiere. Ebenso war die Anzahl an Aufrichtungen während der gesamten Versuchsdauer erhöht. Eine tonische Hyperaktivität der C3H LL Mäuse im Offenfeld-Test konnte anhand dieses Versuches ausgeschlossen werden, da es während der 15-minütigen Versuchsdauer zu einer Reduktion der horizontalen Aktivität kam. Das hyperaktive Verhalten der melatoninprofizienten C3H/HeN Mäuse wird daher vielmehr, wie bereits im Illuminationsversuch 1, als eine lichtinduzierte, depressionsassoziierte Vigilanzstörung interpretiert.

Ein depressionsähnlicher Phänotyp im FST war jedoch weder für melatoninprofiziente C3H/HeN noch melatonindefiziente C57BL6/J Mäuse im Vorversuch zu ermitteln. Melatonindefiziente C57BL6/J Mäuse zeigten in diesem Test sogar eine signifikant verminderte Immobilität, die als ein antidepressiver Phänotyp interpretiert wird (Cryan und Mombereau, 2004). Eine Möglichkeit für das Fehlen eines depressions-

assoziierten Verhaltens bei melatoninprofizienten C3H/HeN Mäusen kann durch die geringe Versuchsdauer (von insgesamt 6 Minuten) und die Konfrontation mit der fremden Versuchsumgebung begründet sein. Unter der Annahme, dass C3H LL Mäuse in einer neuen Umgebung stets zu Beginn mit einer gesteigerten lokomotorischen Aktivität reagieren, macht dieses Verhalten die Detektion eines depressionsähnlichen Phänotyps unter den Standardversuchsbedingungen des FST nicht möglich. Ein depressionsassoziiierter Phänotyp von C3H LL Mäusen wird daher aufgrund der vermuteten Vigilanzstörung auch ohne das Vorliegen einer signifikant erhöhten Immobilität im FST weiterhin in Betracht gezogen. Da dieser Versuch zudem nicht der subjektiven Tageszeit der Tiere angepasst war, ist nicht auszuschließen, dass C3H LL Mäuse zu einer angepassten Tageszeit einen depressionsassoziierten Phänotyp zeigen.

Da Stress als ein wichtiger Faktor bei der Ätiologie depressiver Erkrankungen gesehen wird (Urani *et al.*, 2005), wurden im Vorversuch mRNA Mengen der stressregulativen Gene CRH, CRH BP und CRH R1 in depressionsassoziierten Gehirnarealen der C3H/HeN Mäuse untersucht. Es zeigte sich, dass die veränderte Lichtbedingung zu einer differenziellen Expression in Hippocampus, Amygdala und mPFC von LL Mäusen im Vergleich zu LD Tieren führt. Der unterschiedliche mRNA Anteil der jeweiligen CRH Komponenten in den einzelnen Gehirnregionen steht dabei im Einklang mit den funktionellen Eigenschaften dieser Areale. Sowohl Hippocampus, als auch Amygdala und mPFC sind auf unterschiedliche Weise an der Regulation der PVN Aktivität und der Modulation der Stressachse beteiligt. Der Hippocampus übt durch direkte und indirekte Faserverbindungen eine inhibitorische Funktion auf die parvozellulären Neurone des PVN aus, während die Amygdala dieses Kerngebiet stimulatorisch innerviert. Ferner belegen Läsionsstudien im dorsalen Bereich des mPFC eine verstärkte HHN-Aktivität als Antwort auf akute emotionale Stressoren (Diorio *et al.*, 1993; Radley *et al.*, 2006). Läsionen im *Locus coeruleus*, einem noradrenergen Kerngebiet das inhibitorische Faserverbindungen zum mPFC besitzt, führen dagegen zu einer verminderten HHN-Aktivität (Ziegler *et al.*, 1999). Als Folge der fehlerhaften Funktionsweise dieser komplexen Verschaltungsmechanismen wird eine inadäquate Regulation der HHN-Achse ausgelöst, die im Zusammenhang mit humanen Depressionserkrankungen diskutiert wird (Nemeroff, 1988; Salpolsky, 2000; Nestler *et al.*, 2002). Auch die unterschiedlichen Transkriptmengen der stressregulativen Gene in Hippocampus, Amygdala und mPFC bestärken die Annahme

einer beeinträchtigten Funktionsweise der HHN-Achse bei C3H LL Mäusen. Diese Dysregulation wurde als molekulare Ursache für die Verhaltensauffälligkeiten der lichtexponierten C3H/HeN Mäuse betrachtet und in den anschließenden Illuminationsversuchen weiterführend untersucht.

Als weiteres Validitätskriterium für das Vorliegen eines murinen Depressionsmodells, wurde im Vorversuch der mRNA Gehalt von zwei weiteren Transkripten im mPFC bestimmt. Die Transkripte *Homer1* und *Prkce* (PKC epsilon) wurden ausgewählt, da zwei Microarray Studien zu Kortexgewebe von Ratten übereinstimmend eine differenzielle Regulation dieser Gene in etablierten Depressionsmodellen belegen (Nakatani *et al.*, 2004; Orsetti *et al.*, 2008). Die Rolle dieser Transkripte bei der Entstehung depressiver Erkrankungen ist zur Zeit unklar. Allerdings zeigt eine *postmortem* Untersuchung von humanem Kortexgewebe geringere Mengen des *Prkce* Proteins bei depressiven Patienten, im Vergleich zu gesunden Personen (Shelton *et al.*, 2009). Ferner impliziert eine bisher unveröffentlichte Bildgebende- und Assoziationsstudie die Beteiligung von *Homer1* in der Ätiologie depressiver Erkrankungen des Menschen (Rietschel *et al.*, 2010 in press).

In Übereinstimmung zu den bereits etablierten Depressionsmodellen und den humanen Studien wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit speziesübergreifend bei den lichtexponierten C3H/HeN Mäusen eine differenzielle Expression der beiden Transkripte im mPFC belegt. Diese Parallele ist ein weiteres Indiz für das Vorliegen einer lichtinduzierten, depressionsassoziierten Symptomatik und gleichzeitig eine Stärkung der Konstruktvalidität des neuen Modellansatzes. Ferner untermauern diese Befunde die Inhaltsvalidität des hier vorgestellten, innovativen Mausmodells. Durch eine verlängerte Lichtperiode wird bei C3H/HeN Mäusen ein depressionsähnliches Syndrom induziert, das hilfreich für die Untersuchung depressiver Erkrankungen beim Menschen ist.

Schlussbetrachtung

Der in dieser Arbeit vorgestellte innovative Versuchsansatz einer lichtinduzierten Depression stellt ein neues und interessantes Tiermodell für humane Depressionserkrankungen dar. Es basiert auf einer Störung der circadianen Rhythmik, durch Verlängerung der täglichen Lichtperiode. Nachtaktive, melatoninprofiziente C3H/HeN Mäuse reagieren auf diese Veränderung mit einem depressionsähnlichen und gegenüber Antidepressiva sensitiven Syndrom. Verhaltensweisen, endokrine Marker und molekulare Aspekte weisen eine hohe Parallelität zu anderen Tiermodellen der Depression auf. Im Unterschied zu anderen Tiermodellen für depressive Erkrankungen handelt es sich hierbei allerdings um eine nicht-invasive Methode, die auf der Konfrontation mit einem externen, genau definierten Stressor (Licht) basiert.

In dieser Hinsicht ist besonders die Analogie des hier vorgestellten neuen Modells zur humanpathogenen Situation der SAD bemerkenswert. Bisherige Tiermodelle versuchen bereits möglichst prägnante und gegenüber Antidepressiva sensitive Kernsymptome der Depression zu simulieren. Doch trotz einer großen Anzahl verschiedenartiger Versuchsansätze sind die Resultate häufig widersprüchlich und selbst innerhalb eines Modells häufig nicht kongruent. Ebenso existiert eine Vielzahl an depressiven Patienten, die zwar unter der gleichen Krankheitsbezeichnung geführt werden, sich jedoch in der jeweiligen Depressionssymptomatik deutlich voneinander unterscheiden.

Anhand des hier vorgestellten, innovativen Depressionsmodells ist es möglich, den Zusammenhang zwischen Lichtmenge, circadianem Rhythmus und Auftreten von depressiven Symptomen in Anlehnung an einen bestimmten Subtyp humaner Depressionserkrankungen (SAD) zu untersuchen. Es kann ferner postuliert werden, dass eine Veränderung der circadianen Rhythmik den Gemütszustand bei Maus und Mensch moduliert.

Literaturverzeichnis

- Alt, A., Nisenbaum, E.S., Bleakman, D., Witkin, J.M., 2006. A role for AMPA receptors in mood disorders. *Biochemical Pharmacology* 71, 1273-1288.
- American, P.A., 1994. DSM IV - Diagnostic and statistical manual of psychiatric disorders, 4th ed. American Psychiatric Association, Washington, DC, pp. 620
- Angelucci, F., Aloe, L., Vasquez, P.J., Mathe, A.A., 2000. Mapping the differences in the brain concentration of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in an animal model of depression. *Neuroreport* 11, 1369-1373.
- Anisman, H., Matheson, K., 2005. Stress, depression, and anhedonia: caveats concerning animal models. *Neurosci Biobehav Rev* 29, 525-546.
- Anisman, H., Prakash, P., Merali, Z., Poulter, M.O., 2007. Corticotropin releasing hormone receptor alterations elicited by acute and chronic unpredictable stressor challenges in stressor-susceptible and resilient strains of mice. *Behavioural Brain Research* 181, 180-190.
- Archer, J., 1973. Tests for emotionality in rats and mice: A review. *Animal Behaviour* 21, 205-235.
- Arendt, J., 1995. Melatonin and the mammalian pineal gland. Chapman and Hall, London.
- Aschoff, J., 1955. Tagesperiodik Bei Mausestammen Unter Konstanten Umgebungsbedingungen. *Pflugers Archiv Fur Die Gesamte Physiologie Des Menschen Und Der Tiere* 262, 51-59.
- Bachmanov, A.A., Reed, D.R., Li, X., Beauchamp, G.K., 2002. Genetics of sweet taste preferences. *Pure and Applied Chemistry* 74, 1135-1140.
- Banasr, M., Chowdhury, G.M.I., Terwilliger, R., Newton, S.S., Duman, R.S., Behar, K.L., Sanacora, G., 2010. Glial pathology in an animal model of depression: reversal of stress-induced cellular, metabolic and behavioral deficits by the glutamate-modulating drug riluzole. *Mol Psychiatr* 15, 501-511.

- Banasr, M., Duman, R.S., 2007. Regulation of neurogenesis and gliogenesis by stress and antidepressant treatment. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 6, 311-320.
- Baraban, J.M., Aghajanian, G.K., 1981. Noradrenergic Innervation of Serotonergic Neurons in the Dorsal Raphe - Demonstration by Electron-Microscopic Autoradiography. *Brain Research* 204, 1-11.
- Bartolomucci, A., Leopardi, R., 2009. Stress and depression: preclinical research and clinical implications. *PLoS One* 4, e4265.
- Bekhet, A.K., Zauszniewski, J.A., Nakhla, W.E., 2008. Loneliness: A Concept Analysis. *Nursing Forum* 43, 207-213.
- Belzung, C., 1999. Measuring rodent exploratory behavior. In: Crusio, W.E., Gerlai, R.T. (Ed.), *Handbook of molecular and genetic techniques for brain and behavior research (techniques in the behavioral and neural sciences)*. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 738 - 749.
- Betrus, P.A., Elmore, S.K., 1991. Seasonal affective disorder, Part I: A review of the neural mechanisms for psychosocial nurses. *Arch Psychiatr Nurs* 5, 357-364.
- Bilkei-Gorzo, A., Racz, I., Michel, K., Zimmer, A., Klingmuller, D., 2004. Behavioral phenotype of pre-proenkephalin-deficient mice on diverse congenic backgrounds. *Psychopharmacology (Berl)* 176, 343-352.
- Birtwistle, J., Martin, N., 1999. Seasonal affective disorder: its recognition and treatment. *Br J Nurs* 8, 1004-1009.
- Blazer, D.G., Hybels, C.F., 2005. Origins of depression in later life. *Psychol Med* 35, 1241-1252.
- Branchi, I., D'Andrea, I., Sietzema, J., Fiore, M., Di Fausto, V., Aloe, L., Alleva, E., 2006. Early social enrichment augments adult hippocampal BDNF levels and survival of BrdU-positive cells while increasing anxiety- and "depression"-like behavior. *J Neurosci Res* 83, 965-973.
- Bremner, J.D., Vythilingam, M., Vermetten, E., Nazeer, A., Adil, J., Khan, S., Staib, L.H., Charney, D.S., 2002. Reduced volume of orbitofrontal cortex in major depression. *Biological Psychiatry* 51, 273-279.

- Brown, E.S., Rush, A.J., McEwen, B.S., 1999. Hippocampal Remodeling and Damage by Corticosteroids: Implications for Mood Disorders. *Neuropsychopharmacology* 21, 474-484.
- Brown, G.M., 1994. Light, melatonin and the sleep-wake cycle. *J Psychiatry Neurosci* 19, 345-353.
- Brown, G.W., 1993. Life events and affective disorder: replications and limitations. *Psychosom Med* 55, 248-259.
- Buwalda, B., de Boer, S.F., Van Kalkeren, A.A., Koolhaas, J.M., 1997. Physiological and behavioral effects of chronic intracerebroventricular infusion of corticotropin-releasing factor in the rat. *Psychoneuroendocrinology* 22, 297-309.
- Bunney, W.E., Bunney, B.G., 2000. Molecular clock genes in man and lower animals: possible implications for circadian abnormalities in depression. *Neuropsychopharmacology* 22, 335-345.
- Campbell, S., Macqueen, G., 2004. The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. *J Psychiatry Neurosci* 29, 417-426.
- Capeless, C.G., Whitney, G., 1995. The genetic basis of preference for sweet substances among inbred strains of mice: preference ratio phenotypes and the alleles of the Sac and dpa loci. *Chemical Senses* 20, 291-298.
- Carter-Dawson, L.D., LaVail, M.M., Sidman, R.L., 1978. Differential effect of the rd mutation on rods and cones in the mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17, 489-498.
- Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T.E., Taylor, A., Craig, I.W., Harrington, H., McClay, J., Mill, J., Martin, J., Braithwaite, A., Poulton, R., 2003. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 301, 386-389.
- Claustrat, B., Chazot, G., Brun, J., Jordan, D., Sassolas, G., 1984. A Chronobiological Study of Melatonin and Cortisol Secretion in Depressed Subjects - Plasma Melatonin, a Biochemical Marker in Major Depression. *Biological Psychiatry* 19, 1215-1228.

- Colorado, R.A., Shumake, J., Conejo, N.M., Gonzalez-Pardo, H., Gonzalez-Lima, F., 2006. Effects of maternal separation, early handling, and standard facility rearing on orienting and impulsive behavior of adolescent rats. *Behav Processes* 71, 51-58.
- Conti, A.C., Cryan, J.F., Dalvi, A., Lucki, I., Blendy, J.A., 2002. cAMP response element-binding protein is essential for the upregulation of brain-derived neurotrophic factor transcription, but not the behavioral or endocrine responses to antidepressant drugs. *J Neurosci* 22, 3262-3268.
- Coppen, A., 1967. The biochemistry of affective disorders. *Br J Psychiatry* 113, 1237-1264.
- Crabbe, J.C., 1986. Genetic differences in locomotor activation in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 25, 289-292.
- Crasson, M., Kjiri, S., Colin, A., Kjiri, K., L'Hermite-Baleriaux, M., Ansseau, M., Legros, J.J., 2004. Serum melatonin and urinary 6-sulfatoxymelatonin in major depression. *Psychoneuroendocrinology* 29, 1-12.
- Crawley, J.N., Belknap, J.K., Collins, A., Crabbe, J.C., Frankel, W., Henderson, N., Hitzemann, R.J., Maxson, S.C., Miner, L.L., Silva, A.J., Wehner, J.M., Wynshaw-Boris, A., Paylor, R., 1997. Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology (Berl)* 132, 107-124.
- Cryan, J.F., Markou, A., Lucki, I., 2002. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci* 23, 238-245.
- Cryan, J.F., Mombereau, C., 2004. In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Mol Psychiatry* 9, 326-357.
- Dalton, E.J., Rotondi, D., Levitan, R.D., Kennedy, S.H., Brown, G.M., 2000. Use of slow-release melatonin in treatment-resistant depression. *J Psychiatr Neurosci* 25, 48-52.
- de Bodinat, C., Guardiola-Lemaitre, B., Mocaer, E., Renard, P., Munoz, C., Millan, M.J., 2010. Agomelatine, the first melatonergic antidepressant: discovery, characterization and development. *Nat Rev Drug Discov* 9, 628-642.

- de Foubert, G., Carney, S.L., Robinson, C.S., Destexhe, E.J., Tomlinson, R., Hicks, C.A., Murray, T.K., Gaillard, J.P., Deville, C., Xhenseval, V., Thomas, C.E., O'Neill, M.J., Zetterström, T.S.C., 2004. Fluoxetine-induced change in rat brain expression of brain-derived neurotrophic factor varies depending on length of treatment. *Neuroscience* 128, 597-604.
- de Kloet, E.R., Joels, M., Holsboer, F., 2005. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6, 463-475.
- Delgado, P.L., Miller, H.L., Salomon, R.M., Licinio, J., Krystal, J.H., Moreno, F.A., Heninger, G.R., Charney, D.S., 1999. Tryptophan-depletion challenge in depressed patients treated with desipramine or fluoxetine: implications for the role of serotonin in the mechanism of antidepressant action. *Biol Psychiatry* 46, 212-220.
- Derks, N.M., Muller, M., Gaszner, B., Tilburg-Ouwens, D.T., Roubos, E.W., Kozicz, L.T., 2008. Housekeeping genes revisited: different expressions depending on gender, brain area and stressor. *Neuroscience* 156, 305-309.
- Detanico, B.C., Piato, n.L., Freitas, J.J., Lhullier, F.L., Hidalgo, M.P., Caumo, W., Elisabetsky, E., 2009. Antidepressant-like effects of melatonin in the mouse chronic mild stress model. *European Journal of Pharmacology* 607, 121-125.
- Deussing, J.M., 2006. Animal models of depression. *Drug Discovery Today: Disease Models* 3, 375 – 383.
- Diorio, D., Viau, V., Meaney, M.J., 1993. The Role of the Medial Prefrontal Cortex (Cingulate Gyrus) in the Regulation of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Responses to Stress. *Journal of Neuroscience* 13, 3839-3847.
- Drevets, W.C., Price, J.L., Simpson, J.R., Todd, R.D., Reich, T., Vannier, M., Raichle, M.E., 1997. Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders. *Nature* 386, 824-827.
- Dubocovich, M.L., Mogilnicka, E., Areso, P.M., 1990. Antidepressant-like activity of the melatonin receptor antagonist, luzindole (N-0774), in the mouse behavioral despair test. *European Journal of Pharmacology* 182, 313-325.
- Duman, R.S., Malberg, J., Nakagawa, S., 2001. Regulation of adult neurogenesis by psychotropic drugs and stress. *J Pharmacol Exp Ther* 299, 401-407.

- El Yacoubi, M., Vaugeois, J.M., 2007. Genetic rodent models of depression. *Curr Opin Pharmacol* 7, 3-7.
- Elhwuegi, A.S., 2004. Central monoamines and their role in major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 28, 435-451.
- Fava, M., Kendler, K.S., 2000. Major depressive disorder. *Neuron* 28, 335-341.
- Foster, R.G., Argamaso, S., Coleman, S., Colwell, C.S., Lederman, A., Provencio, I., 1993. Photoreceptors regulating circadian behavior: a mouse model. *J Biol Rhythms* 8 Suppl, S17-23.
- Freis, E.D., 1954. Mental Depression in Hypertensive Patients Treated for Long Periods with Large Doses of Reserpine. *New England Journal of Medicine* 251, 1006-1008.
- Fuchs, E., Flugge, G., 2002. Social stress in tree shrews: Effects on physiology, brain function, and behavior of subordinate individuals. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 73, 247-258.
- Fuchs, E., Kramer, M., Hermes, B., Netter, P., Hiemke, C., 1996. Psychosocial stress in tree shrews: Clomipramine counteracts behavioral and endocrine changes. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 54, 219-228.
- Fuchs, E., Simon, M., Schmelting, B., 2006. Pharmacology of a new antidepressant: benefit of the implication of the melatonergic system. *International Clinical Psychopharmacology* 21, S17-S20.
- Gallagher, P., Young, A.H., 2006. Mifepristone (RU-486) treatment for depression and psychosis: a review of the therapeutic implications. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2, 33-42.
- Gambarana, C., Ghiglieri, O., de Montis, M.G., 1995. Desensitization of the D1 dopamine receptors in rats reproduces a model of escape deficit reverted by imipramine, fluoxetine and clomipramine. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 19, 741-755.
- Garattini, S., Giachetti, A., Jori, A., Pieri, L., Valzelli, L., 1962. Effect of imipramine, amitriptyline and their monomethyl derivatives on reserpine activity. *J Pharm Pharmacol* 14, 509-514.

- Garcia, L.S.B., Comim, C.M., Valvassori, S.S., Réus, G.Z., Stertz, L., Kapczinski, F.v., Gavioli, E.C., Quevedo, J., 2009. Ketamine treatment reverses behavioral and physiological alterations induced by chronic mild stress in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 33, 450-455.
- Garzón, J., Fuentes, J., Del Rio, J., 1979. Antidepressants selectively antagonize the hyperactivity induced in rats by long-term isolation. *European Journal of Pharmacology* 59, 293-296.
- Gittos, M.W., Papp, M., 2001. Antidepressant-like action of AGN 2979, a tryptophan hydroxylase activation inhibitor, in a chronic mild stress model of depression in rats. *European Neuropsychopharmacology* 11, 351-357.
- Glendinning, J.I., Chyou, S., Lin, I., Onishi, M., Patel, P., Zheng, K.H., 2005. Initial licking responses of mice to sweeteners: effects of *tas1r3* polymorphisms. *Chem Senses* 30, 601-614.
- Gold, P.W., Chrousos, G.P., 2002. Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. *Mol Psychiatry* 7, 254-275.
- Gonzalez, M.M., Aston-Jones, G., 2006. Circadian regulation of arousal: role of the noradrenergic locus coeruleus system and light exposure. *Sleep* 29, 1327-1336.
- Goodwin, G.M., 2008. Innovation translates into antidepressant effectiveness. *J Psychopharmacol* 22, 9-12.
- Goto, M., Oshima, I., Tomita, T., Ebihara, S., 1989. Melatonin content of the pineal gland in different mouse strains. *Journal of Pineal Research* 7, 195-204.
- Gould, E., Gross, C.G., 2002. Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *J Neurosci* 22, 619-623.
- Gould, E., Tanapat, P., 1999. Stress and hippocampal neurogenesis. *Biological Psychiatry* 46, 1472-1479.
- Grailhe, R., Waeber, C., Dulawa, S.C., Hornung, J.P., Zhuang, X., Brunner, D., Geyer, M.A., Hen, R., 1999. Increased exploratory activity and altered response to LSD in mice lacking the 5-HT(5A) receptor. *Neuron* 22, 581-591.

- Grailhe, R., Waeber, C., Dulawa, S.C., Hornung, J.P., Zhuang, X., Brunner, D., Geyer, M.A., Hen, R., 1999. Increased exploratory activity and altered response to LSD in mice lacking the 5-HT(5A) receptor. *Neuron* 22, 581-591.
- Grant, E.C., Mackintosh, J.H., 1963. A Comparison of the Social Postures of Some Common Laboratory Rodents. *Behaviour* 21, 246-259.
- Gray, T.S., 1993. Amygdaloid CRF pathways. Role in autonomic, neuroendocrine, and behavioral responses to stress. *Ann N Y Acad Sci* 697, 53-60.
- Grecksch, G., Zhou, D., Franke, C., Schroder, U., Sabel, B., Becker, A., Huether, G., 1997. Influence of olfactory bulbectomy and subsequent imipramine treatment on 5-hydroxytryptaminergic presynapses in the rat frontal cortex: behavioural correlates. *Br J Pharmacol* 122, 1725-1731.
- Griep, A., 2009. Einfluss permanenter Lichteinwirkung auf die adulte Neurogenese im murinen Hippocampus. Institute of Molecular Psychiatry. University of Cologne, Bonn, p. 31.
- Grippe, A.J., Cushing, B.S., Carter, C.S., 2007. Depression-like behavior and stressor-induced neuroendocrine activation in female prairie voles exposed to chronic social isolation. *Psychosom Med* 69, 149-157.
- Grønli, J., Bramham, C., Murison, R., Kanhema, T., Fiske, E., Bjorvatn, B., Ursin, R., Portas, C.M., 2006. Chronic mild stress inhibits BDNF protein expression and CREB activation in the dentate gyrus but not in the hippocampus proper. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 85, 842-849.
- Grønli, J., Murison, R., Fiske, E., Bjorvatn, B., Sørensen, E., Portas, C.M., Ursin, R., 2005. Effects of chronic mild stress on sexual behavior, locomotor activity and consumption of sucrose and saccharine solutions. *Physiology & Behavior* 84, 571-577.
- Haenisch, B., Bilkei-Gorzo, A., Caron, M.G., Bonisch, H., 2009. Knockout of the norepinephrine transporter and pharmacologically diverse antidepressants prevent behavioral and brain neurotrophin alterations in two chronic stress models of depression. *J Neurochem* 111, 403-416.

- Hale, A., Corral, R., Mencacci, O., Ruiz, J.S., Severo, C.A., Gentil, V., 2009. Superior antidepressant efficacy of agomelatine vs fluoxetine in severe major depressive disorder patients: a randomised, double-blind study. *European Neuropsychopharmacology* 19, S418-S419.
- Hardingham, G.E., 2006. Pro-survival signalling from the NMDA receptor. *Biochem Soc T* 34, 936-938.
- Harkin, A., Kelly, J.P., Leonard, B.E., 2003. A review of the relevance and validity of olfactory bulbectomy as a model of depression. *Clinical Neuroscience Research* 3, 253-262.
- Harro, J., Orelund, L., 2001. Depression as a spreading adjustment disorder of monoaminergic neurons: a case for primary implication of the locus coeruleus. *Brain Res Brain Res Rev* 38, 79-128.
- Hashimoto, K., 2010. The role of glutamate on the action of antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*.
- Hasler, G., Drevets, W., Manji, H.K., Charney, D.S., 2004. Discovering Endophenotypes for Major Depression. *Neuropsychopharmacology* 29, 1765-1781.
- Heinrich, L.M., Gullone, E., 2006. The clinical significance of loneliness: a literature review. *Clin Psychol Rev* 26, 695-718.
- Hellweg, R., Zueger, M., Fink, K., Hörtnagl, H., Gass, P., 2007. Olfactory bulbectomy in mice leads to increased BDNF levels and decreased serotonin turnover in depression-related brain areas. *Neurobiology of Disease* 25, 1-7.
- Heninger, G.R., Delgado, P.L., Charney, D.S., 1996. The revised monoamine theory of depression: a modulatory role for monoamines, based on new findings from monoamine depletion experiments in humans. *Pharmacopsychiatry* 29, 2-11.
- Henn, F.A., Vollmayr, B., 2004. Basic pathophysiological mechanisms in depression: what are they and how might they affect the course of the illness? *Pharmacopsychiatry* 37 Suppl 2, S152-156.
- Hill, J.J., Hashimoto, T., Lewis, D.A., 2006. Molecular mechanisms contributing to dendritic spine alterations in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 11, 557-566.

- Holsboer, F., 1999. The rationale for corticotropin-releasing hormone receptor (CRH-R) antagonists to treat depression and anxiety. *J Psychiatr Res* 33, 181-214.
- Holsboer, F., 2000. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology* 23, 477-501.
- Holsboer, F., 2001. Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. *J Affect Disord* 62, 77-91.
- Holsboer, F., Ising, M., 2008. Central CRH system in depression and anxiety -- Evidence from clinical studies with CRH1 receptor antagonists. *European Journal of Pharmacology* 583, 350-357.
- Huhman, K.L., 2006. Social conflict models: can they inform us about human psychopathology? *Horm Behav* 50, 640-646.
- Ibarguen-Vargas, Y., Surget, A., Vourc'h, P., Leman, S., Andres, C.R., Gardier, A.M., Belzung, C., 2009. Deficit in BDNF does not increase vulnerability to stress but dampens antidepressant-like effects in the unpredictable chronic mild stress. *Behavioural Brain Research* 202, 245-251.
- ICD-10 - International Classification of Diseases and Related Health Problems 10 ed. WHO, World Health Organisation (2010) The global burden of disease: 2004 an update, WHO Press, Geneva, Switzerland.
- http://www.who.int/mental_health/management/depression/definition/en
- Iwamoto, K., Kakiuchi, C., Bundo, M., Ikeda, K., Kato, T., 2004. Molecular characterization of bipolar disorder by comparing gene expression profiles of postmortem brains of major mental disorders. *Mol Psychiatry* 9, 406-416.
- Jacobs, B.L., van Praag, H., Gage, F.H., 2000. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Mol Psychiatry* 5, 262-269.
- Jacobson, L.H., Cryan, J.F., 2007. Feeling strained? Influence of genetic background on depression-related behavior in mice: a review. *Behav Genet* 37, 171-213.
- Jesberger, J.A., Richardson, J.S., 1988. Brain output dysregulation induced by olfactory bulbectomy: an approximation in the rat of major depressive disorder in humans? *Int J Neurosci* 38, 241-265.
- Jessberger, S., Kempermann, G., 2003. Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *Eur J Neurosci* 18, 2707-2712.

- Johansson, C., Willeit, M., Smedh, C., Ekholm, J., Paunio, T., Kieseppa, T., Lichtermann, D., Praschak-Rieder, N., Neumeister, A., Nilsson, L.G., Kasper, S., Peltonen, L., Adolfsson, R., Schalling, M., Partonen, T., 2003. Circadian clock-related polymorphisms in seasonal affective disorder and their relevance to diurnal preference. *Neuropsychopharmacology* 28, 734-739.
- Kagamiishi, Y., Yamamoto, T., Watanabe, S., 2003. Hippocampal serotonergic system is involved in anxiety-like behavior induced by corticotropin-releasing factor. *Brain Res* 991, 212-221.
- Kalsbeek, A., Buijs, R.M., van Heerikhuize, J.J., Arts, M., van der Woude, T.P., 1992. Vasopressin-containing neurons of the suprachiasmatic nuclei inhibit corticosterone release. *Brain Res* 580, 62-67.
- Kasper, S., 1994. Diagnosis, Epidemiology and Therapy of the Sad. *Nervenarzt* 65, 69-72.
- Kelly, J.P., Wrynn, A.S., Leonard, B.E., 1997. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: an update. *Pharmacol Ther* 74, 299-316.
- Kempermann, G., 2002. Regulation of adult hippocampal neurogenesis - implications for novel theories of major depression. *Bipolar Disord* 4, 17-33.
- Kempermann, G., Gast, D., Kronenberg, G., Yamaguchi, M., Gage, F.H., 2003. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* 130, 391-399.
- Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B., Kronenberg, G., 2004. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 27, 447-452.
- Kessler, R.C., 1997. The effects of stressful life events on depression. *Annu Rev Psychol* 48, 191-214.
- Klein, D.C., Smoot, R., Weller, J.L., Higa, S., Markey, S.P., Creed, G.J., Jacobowitz, D.M., 1983. Lesions of the paraventricular nucleus area of the hypothalamus disrupt the suprachiasmatic leads to spinal cord circuit in the melatonin rhythm generating system. *Brain Research Bulletin* 10, 647-652.

- Klugmann, M., Wymond Symes, C., Leichtlein, C.B., Klaussner, B.K., Dunning, J., Fong, D., Young, D., During, M.J., 2005. AAV-mediated hippocampal expression of short and long Homer 1 proteins differentially affect cognition and seizure activity in adult rats. *Molecular and Cellular Neuroscience* 28, 347-360.
- Kopp, C., Vogel, E., Rettori, M.C., Delagrange, P., Misslin, R., 1999. The effects of melatonin on the behavioural disturbances induced by chronic mild stress in C3H/He mice. *Behav Pharmacol* 10, 73-83.
- Kozisek, M.E., Middlemas, D., Bylund, D.B., 2008. Brain-derived neurotrophic factor and its receptor tropomyosin-related kinase B in the mechanism of action of antidepressant therapies. *Pharmacol Ther* 117, 30-51.
- Kudryavtseva, N, N., Avgustinovich, D, F., 1998. Behavioral and physiological markers of experimental depression induced by social conflicts (DISC). Wiley-Liss, New York, NY, ETATS-UNIS.
- Kuroda, Y., McEwen, B.S., 1998. Effect of chronic restraint stress and tianeptine on growth factors, growth-associated protein-43 and microtubule-associated protein 2 mRNA expression in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 59, 35-39.
- Lam, R.W., Kripke, D.F., Gillin, J.C., 1989. Phototherapy for depressive disorders: a review. *Can J Psychiatry* 34, 140-147.
- Lam, R.W., Levitt, A.J., Levitan, R.D., Enns, M.W., Morehouse, R., Michalak, E.E., Tam, E.M., 2006. The Can-SAD study: a randomized controlled trial of the effectiveness of light therapy and fluoxetine in patients with winter seasonal affective disorder. *Am J Psychiatry* 163, 805-812.
- Lanahan, A., Worley, P., 1998. Immediate-early genes and synaptic function. *Neurobiol Learn Mem* 70, 37-43.
- Le Minh, N., Damiola, F., Tronche, F., Schutz, G., Schibler, U., 2001. Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators. *EMBO J* 20, 7128-7136.
- Lie, D.C., Song, H., Colamarino, S.A., Ming, G.L., Gage, F.H., 2004. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44, 399-421.

- Lisman, J.E., Grace, A.A., 2005. The hippocampal-VTA loop: Controlling the entry of information into long-term memory. *Neuron* 46, 703-713.
- Liu, R.Y., Unmehopa, U.A., Zhou, J.N., Swaab, D.F., 2006. Glucocorticoids suppress vasopressin gene expression in human suprachiasmatic nucleus. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 98, 248-253
- Luo, X., Kiss, A., Makara, G., Lolait, S.J., Aguilera, G., 1994. Stress-specific regulation of corticotropin releasing hormone receptor expression in the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat. *J Neuroendocrinol* 6, 689-696.
- Ma, X.M., Johnson, R.C., Mains, R.E., Eipper, B.A., 2001. Expression of kalirin, a neuronal GDP/GTP exchange factor of the trio family, in the central nervous system of the adult rat. *J Comp Neurol* 429, 388-402.
- Machado-Vieira, R., Salvadore, G., Diazgranados, N., Zarate, C.A., Jr., 2009. Ketamine and the next generation of antidepressants with a rapid onset of action. *Pharmacol Ther* 123, 143-150.
- Maes, M., Meltzer, H., 1995. The serotonin hypothesis of major depression. In: Bloom F. E., K.D.J. (Ed.), *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. Raven Press, NY, pp. 933-943.
- Makino, S., Hashimoto, K., Gold, P.W., 2002. Multiple feedback mechanisms activating corticotropin-releasing hormone system in the brain during stress. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 73, 147-158.
- Makino, S., Schulkin, J., Smith, M.A., Pacak, K., Palkovits, M., Gold, P.W., 1995. Regulation of corticotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain and pituitary by glucocorticoids and stress. *Endocrinology* 136, 4517-4525.
- Malberg, J.E., Eisch, A.J., Nestler, E.J., Duman, R.S., 2000. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20, 9104-9110.
- Manji, H.K., Drevets, W.C., Charney, D.S., 2001. The cellular neurobiology of depression. *Nat Med* 7, 541-547.

- Mann, J.J., 1999. Role of the serotonergic system in the pathogenesis of major depression and suicidal behavior. *Neuropsychopharmacology* 21, 99S-105S.
- Mann, J.J., Stanley, M., McBride, P.A., McEwen, B.S., 1986. Increased serotonin₂ and beta-adrenergic receptor binding in the frontal cortices of suicide victims. *Arch Gen Psychiatry* 43, 954-959.
- Marcotte, E.R., Srivastava, L.K., Quirion, R., 2001. DNA microarrays in neuropsychopharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 22, 426-436.
- Maris, R.W., 2002. Suicide. *Lancet* 360, 319-326.
- Martneros, A., 2009. Mood disorders: epidemiology and natural history. *Psychiatry* 8, 52-55.
- Martin, A.L., Brown, R.E., 2010. The lonely mouse: Verification of a separation-induced model of depression in female mice. *Behavioural Brain Research* 207, 196-207.
- Mathew, S.J., Manji, H.K., Charney, D.S., 2008. Novel drugs and therapeutic targets for severe mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 33, 2080-2092.
- Mathew, S.J., Manji, H.K., Charney, D.S., 2008. Novel drugs and therapeutic targets for severe mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 33, 2080-2092.
- McClung, C.A., 2007. Circadian genes, rhythms and the biology of mood disorders. *Pharmacol Ther* 114, 222-232.
- McEwen, B.S., 2000. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res* 886, 172-189.
- McEwen, B.S., Magarinos, A.M., 1997. Stress effects on morphology and function of the hippocampus. *Ann N Y Acad Sci* 821, 271-284.
- McKinney, W.T., Jr., Bunney, W.E., Jr., 1969. Animal model of depression. I. Review of evidence: implications for research. *Arch Gen Psychiatry* 21, 240-248.
- Meana, J.J., Barturen, F., Garcia-Sevilla, J.A., 1992. Alpha 2-adrenoceptors in the brain of suicide victims: increased receptor density associated with major depression. *Biol Psychiatry* 31, 471-490.

- Mineur, Y.S., Belzung, C., Crusio, W.E., 2006. Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. *Behavioural Brain Research* 175, 43-50.
- Ming, G.L., Song, H., 2005. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 28, 223-250.
- Mirnics, K., Pevsner, J., 2004. Progress in the use of microarray technology to study the neurobiology of disease. *Nat Neurosci* 7, 434-439.
- Mitchell, A.J., 2006. Two-week delay in onset of action of antidepressants: new evidence. *Br J Psychiatry* 188, 105-106.
- Mizoguchi, K., Yuzurihara, M., Nagata, M., Ishige, A., Sasaki, H., Tabira, T., 2002. Dopamine-receptor stimulation in the prefrontal cortex ameliorates stress-induced rotarod impairment. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 72, 723-728.
- Möller, H.J., Laux, G., Deister, A., 2009. *Psychiatrie und Psychotherapie*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2.Auflage
- Moles, A., Bartolomucci, A., Garbugino, L., Conti, R., Caprioli, A., Coccorello, R., Rizzi, R., Ciani, B., D'Amato, F.R., 2006. Psychosocial stress affects energy balance in mice: Modulation by social status. *Psychoneuroendocrinology* 31, 623-633.
- Mongeau, R., Blier, P., deMontigny, C., 1997. The serotonergic and noradrenergic systems of the hippocampus: Their interactions and the effects of antidepressant treatments. *Brain Research Reviews* 23, 145-195.
- Monleon, J., 1994. 'San Juan', Yesterdays History, Permanent Allegory. *Insula* 49, 15-17.
- Moy, S.S., Nadler, J.J., Perez, A., Barbaro, R.P., Johns, J.M., Magnuson, T.R., Piven, J., Crawley, J.N., 2004. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes Brain and Behavior* 3, 287-302.
- Mucignat-Caretta, C., Bondi, M., Caretta, A., 2004. Animal models of depression: olfactory lesions affect amygdala, subventricular zone and aggression. *Neurobiology of Diseases* 16, 386-395.

- Müller, M.B., Holsboer, F., 2006. Mice with Mutations in the HPA-System as Models for Symptoms of Depression. *Biological Psychiatry* 59, 1104-1115.
- Murphy, L.O., Blenis, J., 2006. MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci* 31, 268-275.
- Nair, A., Vaidya, V.A., 2006. Cyclic AMP response element binding protein and brain-derived neurotrophic factor: molecules that modulate our mood? *J Biosci* 31, 423-434.
- Nakamura, M., Fukushima, H., 1976. The effect of tricyclic antidepressants and neuroleptics on the peripheral and central action of norepinephrine in reserpine-treated mice. *European Journal of Pharmacology* 38, 343-348.
- Nakatani, N., Aburatani, H., Nishimura, K., Semba, J., Yoshikawa, T., 2004. Comprehensive expression analysis of a rat depression model. *Pharmacogenomics J* 4, 114-126.
- Nemeroff, C.B., 1988. The role of corticotropin-releasing factor in the pathogenesis of major depression. *Pharmacopsychiatry* 21, 76-82.
- Nestler, E.J., Barrot, M., DiLeone, R.J., Eisch, A.J., Gold, S.J., Monteggia, L.M., 2002. Neurobiology of Depression. *Neuron* 34, 13-25.
- Nibuya, M., Morinobu, S., Duman, R.S., 1995. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci* 15, 7539-7547.
- Norrholm, S.D., Ouimet, C.C., 2001. Altered dendritic spine density in animal models of depression and in response to antidepressant treatment. *Synapse* 42, 151-163.
- O'Keefe, J., Dostrovsky, J., 1971. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research* 34, 171-175.
- Ohl, F., Keck, M.E., 2003. Behavioural screening in mutagenised mice-in search for novel animal models of psychiatric disorders. *European Journal of Pharmacology* 480, 219-228.
- Orsetti, M., Di Brisco, F., Canonico, P.L., Genazzani, A.A., Ghi, P., 2008. Gene regulation in the frontal cortex of rats exposed to the chronic mild stress paradigm, an animal model of human depression. *Eur J Neurosci* 27, 2156-2164.

- Otmakhova, N.A., Gurevich, E.V., Katkov, Y.A., Nesterova, I.V., Bobkova, N.V., 1992. Dissociation of multiple behavioral effects between olfactory bulbectomized C57Bl/6J and DBA/2J mice. *Physiol Behav* 52, 441-448.
- Pacchierotti, C., Iapichino, S., Bossini, L., Pieraccini, F., Castrogiovanni, P., 2001. Melatonin in Psychiatric Disorders: A Review on the Melatonin Involvement in Psychiatry. *Frontiers in Neuroendocrinology* 22, 18-32.
- Palanza, P., 2001. Animal models of anxiety and depression: how are females different? *Neurosci Biobehav Rev* 25, 219-233.
- Panda, S., Sato, T.K., Castrucci, A.M., Rollag, M.D., DeGrip, W.J., Hogenesch, J.B., Provencio, I., Kay, S.A., 2002. Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science* 298, 2213-2216.
- Pandey, G.N., Ren, X., Rizavi, H.S., Conley, R.R., Roberts, R.C., Dwivedi, Y., 2008. Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase B receptor signalling in post-mortem brain of teenage suicide victims. *Int J Neuropsychopharmacol* 11, 1047-1061.
- Pandi-Perumal, S.R., Srinivasan, V., Maestroni, G.J., Cardinali, D.P., Poeggeler, B., Hardeland, R., 2006. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *Febs Journal* 273, 2813-2838.
- Papp, M., Gruca, P., Boyer, P.A., Mocaer, E., 2003. Effect of agomelatine in the chronic mild stress model of depression in the rat. *Neuropsychopharmacology* 28, 694-703.
- Partonen, T., Lonnqvist, J., 1998. Seasonal affective disorder. *Lancet* 352, 1369-1374.
- Paxinos, G., Franklin, K., 2001. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (Deluxe Edition). Academic Press.
- Penke, Z., Felszeghy, K., Fernet, B., Sage, D., Nyakas, C., Burlet, A., 2001. Post-natal maternal deprivation produces long-lasting modifications of the stress response, feeding and stress-related behaviour in the rat. *Eur J Neurosci* 14, 747-755.
- Pittenger, C., Duman, R.S., 2008. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33, 88-109.

- Plotsky, P.M., Thrivikraman, K.V., Nemeroff, C.B., Caldji, C., Sharma, S., Meaney, M.J., 2005. Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotropin-releasing factor systems in adult male rat offspring. *Neuropsychopharmacology* 30, 2192-2204.
- Porsolt, R.D., 2000. Animal models of depression: utility for transgenic research. *Rev Neurosci* 11, 53-58.
- Porsolt, R.D., Bertin, A., Jalfre, M., 1977. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 229, 327-336.
- Radley, J.J., Rocher, A.B., Miller, M., Janssen, W.G.M., Liston, C., Hof, P.R., McEwen, B.S., Morrison, J.H., 2006. Repeated stress induces dendritic spine loss in the rat medial prefrontal cortex. *Cerebral Cortex* 16, 313-320.
- Rajkowska, G., Miguel-Hidalgo, J.J., 2007. Gliogenesis and glial pathology in depression. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 6, 219-233.
- Reiter, R.J., 1991. Melatonin synthesis: multiplicity of regulation. *Adv Exp Med Biol* 294, 149-158.
- Ressler, K.J., Nemeroff, C.B., 2000. Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. *Depression and Anxiety* 12, 2-19.
- Reul, J.M., de Kloet, E.R., 1985. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117, 2505-2511.
- Richter, H.G., Torres-Farfan, C., Rojas-Garcia, P.P., Campino, C., Torrealba, F., Seron-Ferre, M., 2004. The circadian timing system: making sense of day/night gene expression. *Biol Res* 37, 11-28.
- Rietschel, M.M., M; Frank, J; Treutlein, J; Degenhardt, F; Breuer, R; Steffens, M; Mier, D; Esslinger, C; Walter, H; Kirsch, P; Erk, S; Schnell, K; Herms, S; Wichmann, HE; Schreiber, S; Jöckel, KH; Strohmaier, J; Roeske, S; Gross, M; Hoefels, S; Lucae, S; Binder, EB; Wienker, TF; Schulze, TG; Schmä, C; Zimmer, A; Bettecken, T; Meyer-Lindenberg, A; Müller-Myhsok, B; Maier, W; Nöthen, MM and Cichon, S, 2010. Genome-wide association-, replication- and neuroimaging study implicates HOMER1 in the aetiology of major depression. *Biol. Psychiatry*.

- Rios, M., Fan, G., Fekete, C., Kelly, J., Bates, B., Kuehn, R., Lechan, R.M., Jaenisch, R., 2001. Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Molecular Endocrinology* 15, 1748-1757.
- Rosenthal, N.E., Sack, D.A., Gillin, J.C., Lewy, A.J., Goodwin, F.K., Davenport, Y., Mueller, P.S., Newsome, D.A., Wehr, T.A., 1984. Seasonal affective disorder. A description of the syndrome and preliminary findings with light therapy. *Arch Gen Psychiatry* 41, 72-80.
- Rossi-Arnaud, C., Ammassari-Teule, M., 1998. What do comparative studies of inbred mice add to current investigations on the neural basis of spatial behaviors? *Exp Brain Res* 123, 36-44.
- Roy, A., De Jong, J., Linnoila, M., 1989. Cerebrospinal fluid monoamine metabolites and suicidal behavior in depressed patients. A 5-year follow-up study. *Arch Gen Psychiatry* 46, 609-612.
- Roy, A., Pickar, D., De Jong, J., Karoum, F., Linnoila, M., 1988. Norepinephrine and its metabolites in cerebrospinal fluid, plasma, and urine. Relationship to hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in depression. *Arch Gen Psychiatry* 45, 849-857.
- Ryan, M.M., Lockstone, H.E., Huffaker, S.J., Wayland, M.T., Webster, M.J., Bahn, S., 2006. Gene expression analysis of bipolar disorder reveals downregulation of the ubiquitin cycle and alterations in synaptic genes. *Mol Psychiatr* 11, 965-978.
- Rygula, R., Abumaria, N., Flugge, G., Fuchs, E., Ruther, E., Havemann-Reinecke, U., 2005. Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress. *Behav Brain Res* 162, 127-134.
- Sacharczuk, M., Sadowski, B., Jaszczak, K., Lipkowski, A.W., Swiergiel, A.H., 2010. Opposite effects of alcohol in regulating stress-induced changes in body weight between the two mouse lines with enhanced or low opioid system activity. *Physiology & Behavior* 99, 627-631.
- Sahay, A., Hen, R., 2007. Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nat Neurosci* 10, 1110-1115.
- Sairanen, M., O'Leary, O.F., Knuuttila, J.E., Castren, E., 2007. Chronic antidepressant treatment selectively increases expression of plasticity-related proteins in the hippocampus and medial prefrontal cortex of the rat. *Neuroscience* 144, 368-374.

- Sams-Dodd, F., 1999. Phencyclidine in the social interaction test: an animal model of schizophrenia with face and predictive validity. *Rev Neurosci* 10, 59-90.
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C., Hen, R., 2003. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301, 805-809.
- Sapolsky, R.M., 2000. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry* 57, 925-935.
- Sapolsky, R.M., 2004. Is impaired neurogenesis relevant to the affective symptoms of depression? *Biol Psychiatry* 56, 137-139.
- Schildkraut, J.J., 1965. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Amer. J. Psychiat* 122, 609-622.
- Schweizer, M.C., Henniger, M.S., Sillaber, I., 2009. Chronic mild stress (CMS) in mice: of anhedonia, 'anomalous anxiolysis' and activity. *PLoS One* 4, e4326.
- Sevy, S., Papadimitriou, G.N., Surmont, D.W., Goldman, S., Mendlewicz, J., 1989. Noradrenergic function in generalized anxiety disorder, major depressive disorder, and healthy subjects. *Biol Psychiatry* 25, 141-152.
- Sheline, Y.I., Wang, P.W., Gado, M.H., Csernansky, J.G., Vannier, M.W., 1996. Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3908-3913.
- Shelton, R.C., Hal Manier, D., Lewis, D.A., 2009. Protein kinases A and C in post-mortem prefrontal cortex from persons with major depression and normal controls. *Int J Neuropsychopharmacol* 12, 1223-1232.
- Shirayama, Y., Chen, A.C., Nakagawa, S., Russell, D.S., Duman, R.S., 2002. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci* 22, 3251-3261.
- Shively, C., Kaplan, J., 1984. Effects of social factors on adrenal weight and related physiology of *Macaca fascicularis*. *Physiol Behav* 33, 777-782.
- Siever, L.J., Davis, K.L., 1985. Overview: toward a dysregulation hypothesis of depression. *Am J Psychiatry* 142, 1017-1031.

- Simon, P., Fehrenbach, E., Niess, A.M., 2006. Regulation of immediate early gene expression by exercise: short cuts for the adaptation of immune function. *Exerc Immunol Rev* 12, 112-131.
- Smith, M.A., Makino, S., Kvetnansky, R., Post, R.M., 1995. Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J Neurosci* 15, 1768-1777.
- Song, C., Leonard, B.E., 2005. The olfactory bulbectomised rat as a model of depression. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 29, 627-647.
- Soriano, F.X., Hardingham, G.E., 2007. Compartmentalized NMDA receptor signaling to survival and death. *J Physiol* 584, 381-387.
- Souetre, E., Martin, P., Lozet, H., Monteban, H., 1996. Quality of life in depressed patients: comparison of fluoxetine and major tricyclic antidepressants. *Int Clin Psychopharmacol* 11, 45-52.
- Srinivasan, V., Smits, M., Spence, W., Lowe, A.D., Kayumov, L., Pandi-Perumal, S.R., Parry, B., Cardinali, D.P., 2006. Melatonin in mood disorders. *World J Biol Psychiatry* 7, 138-151.
- Srinivasan, V., Spence, D.W., Pandi-Perumal, S.R., Trakht, I., Cardinali, D.P., 2008. Jet lag: therapeutic use of melatonin and possible application of melatonin analogs. *Travel Med Infect Dis* 6, 17-28.
- Stavreva, D.A., Wiench, M., John, S., Conway-Campbell, B.L., McKenna, M.A., Pooley, J.R., Johnson, T.A., Voss, T.C., Lightman, S.L., Hager, G.L., 2009. Ultradian hormone stimulation induces glucocorticoid receptor-mediated pulses of gene transcription. *Nat Cell Biol* 11, 1093-U1111.
- Stein, E.J., Filho, N.G.d.S., Machado, D.C., Hipólido, D.C., Barlow, K., Nobrega, J.N., 2009. Chronic mild stress induces widespread decreases in thyroid hormone [α]1 receptor mRNA levels in brain--Reversal by imipramine. *Psychoneuroendocrinology* 34, 281-286.
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., Simon, P., 1985. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 85, 367-370.

- Stunkard, A.J., Faith, M.S., Allison, K.C., 2003. Depression and obesity. *Biological Psychiatry* 54, 330-337.
- Sullivan, P.F., Neale, M.C., Kendler, K.S., 2000. Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. *Am J Psychiatry* 157, 1552-1562.
- Tao, X., Finkbeiner, S., Arnold, D.B., Shaywitz, A.J., Greenberg, M.E., 1998. Ca^{2+} influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 20, 709-726.
- Taupin, P., Gage, F.H., 2002. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res* 69, 745-749.
- Törk, I., 1990. Anatomy of the serotonergic system. *Ann N Y Acad Sci* 600, 9-34; discussion 34-35.
- Touma, C., Bunck, M., Glasl, L., Nussbaumer, M., Palme, R., Stein, H., Wolferstätter, M., Zeh, R., Zimbelmann, M., Holsboer, F., Landgraf, R., 2008. Mice selected for high versus low stress reactivity: A new animal model for affective disorders. *Psychoneuroendocrinology* 33, 839-862.
- Urani, A., Chourbaji, S., Gass, P., 2005. Mutant mouse models of depression: candidate genes and current mouse lines. *Neurosci Biobehav Rev* 29, 805-828.
- Vaidya, V.A., Duman, R.S., 2001. Depression - emerging insights from neurobiology. *British Medical Bulletin* 57, 61-79.
- Valentine, G.W., Sanacora, G., 2009. Targeting glial physiology and glutamate cycling in the treatment of depression. *Biochem Pharmacol* 78, 431-439.
- van Praag, H., Schinder, A.F., Christie, B.R., Toni, N., Palmer, T.D., Gage, F.H., 2002. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415, 1030-1034.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, RESEARCH0034.

- Vitale, G., Ruggieri, V., Filaferro, M., Frigeri, C., Alboni, S., Tascedda, F., Brunello, N., Guerrini, R., Cifani, C., Massi, M., 2009. Chronic treatment with the selective NOP receptor antagonist [Nphe(1),Arg (14),Lys (15)]N/OFQ-NH (2) (UFP-101) reverses the behavioural and biochemical effects of unpredictable chronic mild stress in rats. *Psychopharmacology (Berl)*.
- Vollmayr, B., Faust, H., Lewicka, S., Henn, F.A., 2001. Brain-derived-neurotrophic-factor (BDNF) stress response in rats bred for learned helplessness. *Mol Psychiatry* 6, 471-474, 358.
- Vollmayr, B., Simonis, C., Weber, S., Gass, P., Henn, F., 2003. Reduced cell proliferation in the dentate gyrus is not correlated with the development of learned helplessness. *Biological Psychiatry* 54, 1035-1040.
- Von Frijtag, J.C., Van den Bos, R., Spruijt, B.M., 2002. Imipramine restores the long-term impairment of appetitive behavior in socially stressed rats. *Psychopharmacology (Berl)* 162, 232-238.
- Wang, S.S., Kamphuis, W., Huitinga, I., Zhou, J.N., Swaab, D.F., 2008. Gene expression analysis in the human hypothalamus in depression by laser microdissection and real-time PCR: the presence of multiple receptor imbalances. *Mol Psychiatry* 13, 786-799, 741.
- Wehr, T.A., Jacobsen, F.M., Sack, D.A., Arendt, J., Tamarkin, L., Rosenthal, N.E., 1986. Phototherapy of seasonal affective disorder. Time of day and suppression of melatonin are not critical for antidepressant effects. *Arch Gen Psychiatry* 43, 870-875.
- Weidenfeld, J., Itzik, A., Feldman, S., 1997. Effect of glucocorticoids on the adrenocortical axis responses to electrical stimulation of the amygdala and the ventral noradrenergic bundle. *Brain Res* 754, 187-194.
- Weingartner, H., Silberman, E., 1982. Models of cognitive impairment: cognitive changes in depression. *Psychopharmacol Bull* 18, 27-42.
- Weiss, J.M.a.K., C.D., 1998. Animal models of depression and schizophrenia. In: Nemeroff, C.B.a.S., A.F. (Ed.), *The American Psychiatric Press Textbook of Psychopharmacology*. American Psychiatric Press Inc., Washington, DC, pp. 89–131.

- Weiss, S.R., Post, R.M., Gold, P.W., Chrousos, G., Sullivan, T.L., Walker, D., Pert, A., 1986. CRF-induced seizures and behavior: interaction with amygdala kindling. *Brain Res* 372, 345-351.
- WHO Publications Center USA, NY 2009
- Willner, P., 1990. Animal models of depression: an overview. *Pharmacol Ther* 45, 425-455.
- Willner, P., 1997. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)* 134, 319-329.
- Willner, P., 2005. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology* 52, 90-110.
- Willner, P., Muscat, R., Papp, M., 1992. Chronic mild stress-induced anhedonia: A realistic animal model of depression. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 16, 525-534.
- Winslow, J.T., Insel, T.R., 2002. The social deficits of the oxytocin knockout mouse. *Neuropeptides* 36, 221-229.
- Wirz-Justice, A., 2006. Biological rhythm disturbances in mood disorders. *Int Clin Psychopharmacol* 21 Suppl 1, S11-15.
- Wolkowitz, O.M., Reus, V.I., Manfredi, F., Ingbar, J. Brizendine, L., 1993. Ketoconazole administration in hypercortisolemic depression. *The American Journal of Psychiatry* 150, 810-812
- Xie, Z., Srivastava, D.P., Photowala, H., Kai, L., Cahill, M.E., Woolfrey, K.M., Shum, C.Y., Surmeier, D.J., Penzes, P., 2007. Kalirin-7 controls activity-dependent structural and functional plasticity of dendritic spines. *Neuron* 56, 640-656.
- Yoshikawa, T., Watanabe, A., Ishitsuka, Y., Nakaya, A., Nakatani, N., 2002. Identification of multiple genetic loci linked to the propensity for "behavioral despair" in mice. *Genome Research* 12, 357-366.
- Youn, H.S., Jeoung, M.K., Koo, Y.B., Ji, H.L., Markesbery, W.R., Ji, I.H., Ji, T.H., 2007. Kalirin is under-expressed in Alzheimer's disease hippocampus. *J Alzheimers Dis* 11, 385-397.

- Zhou, J.N., Riemersma, R.F., Unmehopa, U.A., Hoogendijk, W.J., van Heerikhuize, J.J., Hofman, M.A., Swaab, D.F., 2001. Alterations in arginine vasopressin neurons in the suprachiasmatic nucleus in depression. *Arch Gen Psychiatry* 58, 655-662.
- Ziegler, D.R., Cass, W.A., Herman, J.P., 1999. Excitatory influence of the locus coeruleus in hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responses to stress. *Journal of Neuroendocrinology* 11, 361-369.
- Zueger, M., Urani, A., Chourbaji, S., Zacher, C., Roche, M., Harkin, A., Gass, P., 2005. Olfactory bulbectomy in mice induces alterations in exploratory behavior. *Neuroscience Letters* 374, 142-146.

Anhang

Differenziell regulierte Gene zwischen LL W und LD W:

Gen-symbol	Regu- lierung	differenzielle Expression	Probe Set ID	Genbezeichnung
Egr2	+	3,146	1427683_at	early growth response 2
Egr2	+	2,681	1427682_a_at	early growth response 2
Nr4a2	*	2,663	1447863_s_at	nuclear receptor subfamily 4, gro+ A, member 2
Lsr	+	2,505	1451255_at	lipolysis stimulated lipoprotein receptor
Homer1	*	2,454	1436387_at	RIKEN cDNA C330006P03 gene
Fos	+	2,308	1423100_at	FBJ osteosarcoma oncogene
Csmd1	+	2,205	1446273_at	CUB and Sushi multiple domains 1
Adm	+	2,193	1416077_at	adrenomedullin
Schip1	+	2,145	1437700_at	Schwannomin interacting protein 1 (Schip1),
Mpa2l	+	2,074	1447927_at	macrophage activation 2 like
Shprh	+	1,997	1430582_at	SNF2 histone linker PHD RING helicase
Dusp4	+	1,995	1428834_at	dual specificity phosphatase 4
Kirrel3	+	1,993	1431402_at	kin of IRRE like 3 (Drosophila)
Prg4	+	1,934	1449824_at	proteoglycan 4 (megakaryocyte stimulating factor
Kalrn	*	1,919	1457690_at	kalirin, RhoGEF kinase
	+	1,895	1444973_at	
Nr4a2	*	1,865	1450750_a_at	nuclear receptor subfamily 4, gro+ A, member 2
Nr4a1	+	1,844	1416505_at	nuclear receptor subfamily 4, gro+ A, member 1
Tspan8	+	1,82	1424649_a_at	tetraspanin 8
Lgals3bp	+	1,777	1448380_at	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein
	+	1,753	1458697_at	
Ino80e	+	1,752	1451347_at	INO80 complex subunit E
Cdh10	+	1,751	1460538_at	cadherin 10
Arih1	+	1,751	1427189_at	ariadne ubiquitin-conjugating enzyme E2 binding protein
	+	1,749	1444728_at	
Smg1	+	1,748	1455657_at	SMG1 homolog, phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase
	+	1,747	1459008_at	
Nr4a2	*	1,741	1455034_at	nuclear receptor subfamily 4, gro+ A, member 2
Slc1a3	+	1,736	1439072_at	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter)
Ankrd11	+	1,715	1458452_at	Ankyrin repeat domain 11
Cdkn1a	+	1,714	1421679_a_at	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)
Mbp	+	1,703	1425263_a_at	myelin basic protein
Insm1	+	1,694	1421399_at	insulinoma-associated 1
Bdnf	+	1,694	1422169_a_at	brain derived neurotrophic factor
Kcnj13	+	1,685	1456418_at	potassium inwardly-rectifying channel, member 13
Baz1b	+	1,668	1450068_at	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B
Greb1	+	1,668	1439568_at	gene regulated by estrogen in breast cancer protein
Vasn	+	1,666	1427894_at	vasorin
Gng2	+	1,665	1418452_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 2
Cabin1	+	1,66	1437794_at	calcineurin binding protein 1
Kif1b	+	1,654	1455182_at	kinesin family member 1B

Atf7	+	1,646	1437645_at	activating transcription factor 7
Sdf2l1	+	1,642	1418206_at	stromal cell-derived factor 2-like 1
Egr1	+	1,638	1417065_at	early growth response 1
Macf1	+	1,635	1439582_at	Microtubule-actin crosslinking factor (Macf)
	+	1,626	1456159_at	
Pnn	+	1,624	1423325_at	pinin
Fosl2	+	1,622	1437247_at	fos-like antigen 2 /// similar to fos-like antigen 2
	-	1,927	1440773_at	
Melk	-	1,816	1416558_at	maternal embryonic leucine zipper kinase
Ripply2	-	1,805	1447726_at	rippy2 homolog (zebrafish)
Ltf	-	1,744	1450009_at	lactotransferrin
Alkbh5	-	1,736	1437728_at	alkB, alkylation repair homolog 5 (E. coli)
Eif2a	-	1,727	1434452_x_at	eukaryotic translation initiation factor 2a
EG626231	-	1,726	1460021_at	predicted gene, EG626231
	-	1,716	1459234_at	
Slc17a6	-	1,7	1418610_at	solute carrier family 17 member 6
Bcas2	-	1,675	1437262_x_at	breast carcinoma amplified sequence 2
Pex6	-	1,674	1456302_at	peroxisomal biogenesis factor 6
Rrm2b	-	1,648	1437221_at	ribonucleotide reductase M2 B (TP53 inducible)
Gja5	-	1,646	1429101_at	gap junction membrane channel protein alpha 5
100040437	-	1,644	1439199_at	predicted gene, 100040437
	-	1,643	1458640_at	
Rrm2b	-	1,637	1437222_x_at	ribonucleotide reductase M2 B (TP53 inducible)
Fam148c	-	1,632	1443344_at	family with sequence similarity 148, member C
	-	1,631	1456161_at	RIKEN cDNA 0610040B10 gene
BC031441	-	1,627	1442739_at	cDNA sequence BC031441
Slc4a1	-	1,625	1416464_at	solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1
	-	1,622	1447223_at	
Drd1a	*	1,404	1456051_at	dopamine receptor D1A

*Die mit dem Stern gekennzeichneten Gene wurden mit Hilfe der qRT-PCR validiert

Gene, die mit einem Pluszeichen (+) in der Regulierung versehen sind, zeigen einen Anstieg der Genexpression in Gewebeproben der LL Gruppe im Vergleich zu den Proben der LD Gruppe. Minuszeichen (-) bedeuten dagegen eine verminderte Genexpression bei der LL Gruppe im Vergleich zur LD Gruppe.

Differenziell regulierte Gene zwischen LL F und LD F:

Gen-symbol	Regu- lierung	differenzielle Expression	Probe Set ID	Genbezeichnung
Nrxn1	-	8,992	1433413_at	neurexin I
Rlf	-	7,175	1439555_at	rearranged L-myc fusion sequence
Birc6	-	6,521	1427488_a_at	baculoviral IAP repeat-containing 6
Cdkl2	-	6,313	1457625_s_at	cyclin-dependent kinase-like 2 (CDC2-related kinase)
Ifngr2	-	6,023	1423557_at	interferon gamma receptor 2
Herc1	-	5,959	1440437_at	hect (homologous to the E6-AP (UBE3A) carboxyl terminus)
Crebbp	-	5,91	1459804_at	CREB binding protein
Nell2	-	5,693	1423560_at	NEL-like 2 (chicken)
Bat2d	-	5,551	1429432_at	BAT2 domain containing 1
Baz1b	-	5,273	1450068_at	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B
Hif1a	-	4,967	1448183_a_at	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit
Ppp1r9a	-	4,748	1457603_at	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 9A
Eif4g1	-	4,663	1427037_at	eukaryotic translation initiation factor 4, gamma 1
Copg2as2	*	4,637	1452479_at	coatomer protein complex, subunit gamma 2, antisense 2
Pnmal2	-	4,589	1438363_at	PNMA-like 2
Pcp4l1	-	4,183	1452913_at	Purkinje cell protein 4-like 1
Tmx4	-	4,125	1435770_at	thioredoxin-related transmembrane protein 4
Smc1a	-	3,93	1417832_at	structural maintenance of chromosomes 1A
Slc43a2	-	3,896	1456940_at	solute carrier family 43, member 2
Ppm1l	-	3,856	1435699_at	protein phosphatase 1 (formerly 2C)-like
Atrx	-	3,752	1450051_at	alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked
Malat1	-	3,75	1452378_at	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1
Scd2	-	3,61	1415824_at	stearyl-Coenzyme A desaturase 2
Galnt16	-	3,591	1431080_at	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine transferase-like 6
	-	3,57	1439605_at	
Cep350	-	3,558	1452470_at	centrosomal protein 350
Aff3	-	3,53	1430435_at	AF4/FMR2 family, member 3
Tcerg1	-	3,42	1450100_a_at	transcription elongation regulator 1 (CA150)
Ndst3	-	3,41	1453777_a_at	N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 3
Plcb1	-	3,341	1425600_a_at	phospholipase C, beta 1
R3hdm1	-	3,336	1458539_at	R3H domain 1 (binds single-stranded nucleic acids)
Cbx5	-	3,291	1421933_at	chromobox homolog 5 (Drosophila HP1a)
Necab1	-	3,27	1457142_at	N-terminal EF-hand calcium binding protein 1
Zkscan1	-	3,24	1439908_at	zinc finger with KRAB and SCAN domains 1
Dnm3	-	3,188	1438801_at	dynamitin 3
	-			neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4
Nedd4	-	3,174	1421955_a_at	
	-	3,127	1456319_at	
Gng2	-	3,063	1418452_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 2
Malat1	-	3,038	1418189_s_at	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1
Atf7	-	3,022	1437645_at	activating transcription factor 7
Gad2	-	3,008	1421978_at	glutamic acid decarboxylase 2
Adipor2	-	2,996	1437864_at	adiponectin receptor 2
Rab6b	-	2,983	1437107_at	RAB6B, member RAS oncogene family
Fam20b	-	2,964	1451667_at	family with sequence similarity 20, member B

Scaper	-	2,952	1437657_at	S phase cyclin A-associated protein in the ER
Pnn	-	2,941	1423325_at	pinin
Samd5	-	2,893	1437403_at	sterile alpha motif domain containing 5
Slk	-	2,864	1419092_a_at	STE20-like kinase (yeast)
Rapgef6	-	2,863	1443877_a_at	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6
Taok1	-	2,859	1424658_at	TAO kinase 1
Slc16a14	-	2,82	1430629_at	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 14
Ankhd1	-	2,794	1448008_at	ankyrin repeat and KH domain containing 1
Xpr1	-	2,778	1426993_at	xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1
Cab39	-	2,776	1418432_at	calcium binding protein 39
Cabin1	-	2,767	1437794_at	calcineurin binding protein 1
Slmap	-	2,759	1426458_at	sarcolemma associated protein
Malat1	-	2,755	1418188_a_at	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1
Cnr1	-	2,753	1419425_at	cannabinoid receptor 1 (brain)
Ubtf	-	2,746	1460304_a_at	upstream binding transcription factor, RNA polymerase I
Jmy	-	2,726	1451878_a_at	junction-mediating and regulatory protein
Utrn	-	2,702	1426892_at	utrophin
Bclaf1	-	2,698	1436023_at	BCL2-associated transcription factor 1
Garnl1	-	2,635	1458685_at	GTPase activating RANGAP domain-like 1
Shprh	-	2,595	1430582_at	SNF2 histone linker PHD RING helicase
Acbd3	-	2,537	1456316_a_at	acyl-Coenzyme A binding domain containing 3
Gas2l3	-	2,408	1437244_at	growth arrest-specific 2 like 3
Plec1	-	2,313	1437554_at	plectin 1
Egr2	+	2,628	1427683_at	early growth response 2
Nr4a2	*	2,055	1450750_a_at	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2
Homer1	*	1,802	1436387_at	RIKEN cDNA C330006P03 gene

*Die mir dem Stern gekennzeichneten Gene wurden mit Hilfe der qRT-PCR validiert

Gene, die mit einem Pluszeichen (+) in der Regulierung versehen sind, zeigen einen Anstieg der Genexpression in Gewebeproben der LL F Gruppe im Vergleich zu den Proben der LD F Gruppe. Minuszeichen (-) bedeuten dagegen eine verminderte Genexpression bei der LL F Gruppe im Vergleich zur LD F Gruppe.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte, fremde Hilfe angefertigt zu haben. Ich habe keine anderen als die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen benutzt. Sämtliche Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachten Dienstleistungen sind ebenfalls als solche gekennzeichnet.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Becker, A. Bilkei-Gorzo, A. Michel, K. Zimmer, A. (2010):

Exposure of mice to long-light: A new animal model to study depression, Eur.Neuropsychopharmacol. (2010), doi:10.1016/j.neuro.2010.07.009

Astrid Becker

Publikationen und Preise

- | | |
|------|--|
| 2010 | <u>Becker, A.</u> Bilkei-Gorzo, A. Michel, K. Zimmer, A.
Exposure of mice to long-light: A new animal model to study depression, Eur.Neuropsychopharmacol. (2010), doi:10.1016/j.neuro.2010.07.009 |
| 2010 | Lim, S., Janzer, A., <u>Becker, A.</u> , Zimmer, A., Schule, R., Buettner, R., and Kirfel, J. Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) is highly expressed in ER-negative breast cancers and a biomarker predicting aggressive biology. Carcinogenesis (2010) 31: 512-520. |
| 2008 | <u>Becker, A.</u> , Drews, E., Bilkei-Gorzo A., Zimmer, A.
Animal models of affective behaviours and drug addiction. In Biomarkers for psychiatric disorders 1 st Edition (Edited by Turck, C.) Springer (2008), pp 212 – 234. |
| 2007 | Chimaira Diplom-Wissenschaftspreis (2. Platz)
Thema: Infrarot-Detektion und -Verarbeitung bei Klapperschlangen |